

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

**Expression und Wirkung von Erythropoietin während der  
Retinaentwicklung der Maus**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg- Essen

Vorgelegt von  
Nina Alexandra Scheerer  
aus Bochum

2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting  
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Fandrey  
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. B. Jurklies  
3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. W. Jelkmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.Dezember 2010

## **Publikationen**

Scheerer N., Dünker N., Imagawa S., Yamamoto M., Suzuki N., Fandrey J. (2010):  
The anemia of the newborn induces erythropoietin expression in the developing  
mouse retina. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. In Press.

Beier M., Franke A., Paunel-Gorgülü A.N., Scheerer N., Duenker N. (2006):  
Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all  
programmed cell death periods of the developing murine retina.  
*Neurosci Res.* 56, 193-203.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Erythropoietin	8
1.1.1	<i>Struktur, Expression und Abbau</i>	8
1.1.2	<i>Regulation der Expression</i>	8
1.1.3	<i>Mechanismen der Funktion</i>	11
1.1.4	<i>Expression und Funktion von Erythropoietin in neuronalen Zellen</i>	13
1.2	Die Retinaentwicklung der Maus als Modell physiologischer Apoptose von Nervenzellen	15
1.2.1	<i>Mechanismen der Apoptose</i>	15
1.2.2	<i>Retinaentwicklung und –aufbau</i>	18
1.2.3	<i>Apoptose während der Retinaentwicklung der Maus</i>	19
1.3	Ziel der Dissertation	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
2.1	Verwendete Geräte und Substanzen	24
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	24
2.1.2	<i>Substanzen</i>	27
2.2	Methoden	29
2.2.1	<i>Präparation von Wholemount-Retinae und ihre organotypische Kultur</i>	29
2.2.2	<i>Apoptosedetektion</i>	31
2.2.3	<i>Immunzytochemie an Cytospins</i>	32
2.2.4	<i>RNS-Präparation und cDNS-Synthese</i>	34
2.2.5	<i>PCR und real-time PCR</i>	35
2.2.6	<i>Hämatokrit- und Hämoglobinmessungen</i>	37
2.2.7	<i>Proteinisolierung</i>	38
2.2.8	<i>Proteinbestimmung</i>	38
2.2.9	<i>Western Blot Analyse</i>	39
2.2.10	<i>Epo-ELISA</i>	40

2.2.11	<i>Caspase-Assay</i>	41
2.2.12	<i>Wholemout-Kultur in Hypoxie und Hyperoxie</i>	42
2.2.13	<i>Immunhistochemie an Cryostatschnitten von 17k- und 22k-Epo-GFP Mäusen</i>	42
2.2.14	<i>Statistik</i>	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
3.1	Expression von Epo während der Retinaentwicklung der Maus	45
3.1.1	<i>Epo-mRNS Expression der murinen Retina</i>	45
3.1.2	<i>Korrelation der retinalen mit der renalen und hepatischen Epo-mRNS Expression sowie mit den Hämoglobin- und Hämatokritwerten</i>	46
3.1.3	<i>Nachweis von Epo-Protein in der Retina</i>	48
3.1.4	<i>Identifikation der Epo-exprimierenden Zellen</i>	48
3.2	Hypoxie-induzierbarer Faktor-Expression und -Regulation in der murinen Retina	51
3.3	Funktion von Epo während der postnatalen Retinaentwicklung der Maus	52
3.3.1	<i>Nachweis von EpoR-mRNS</i>	53
3.3.2	<i>Neuroprotektive Funktion von Epo während der postnatalen Zelltodphasen</i>	54
3.3.3	<i>Identifikation der Zielzellen von Epo</i>	55
3.3.4	<i>Interaktion von Epo mit TGF-<math>\beta</math> und Insulin</i>	56
3.4	Mechanismen der neuroprotektiven Funktion von Epo	58
3.4.1	<i>Nachweis verstärkter STAT-5 Phosphorylierung durch Epo</i>	58
3.4.2	<i>Einfluss von Epo auf die mRNS-Expression von Bcl-2 und Bax</i>	59
3.4.3	<i>Auswirkungen von Epo auf die Caspase-3 Aktivität</i>	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
4.1	Retinale Epo-Expression während postnataler Entwicklung	62
4.2	HIF-Expression und -Regulation in der murinen Retina	65
4.3	Funktionelle Bedeutung von Epo für eine adäquate Retinaentwicklung	67
4.4	Molekulare Mechanismen der Funktion von Epo in der Retina	69

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>86</b>

## 1 Einleitung

Erythropoietin (Epo) wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts als das Hormon entdeckt, das die Erythropoiese stimuliert und dessen Mangel dementsprechend zur Anämie führt.

Seit 1906 zum ersten Mal von P. Carnot und Cl. Deflandre die Hypothese einer humoralen Regulation der Erythropoiese formuliert wurde, war Epo, benannt 1948 von E. Bonsdorff und E. Jalavisto, bis zum heutigen Tag Gegenstand intensiver Forschung (Fandrey 2004).

So gelang es in den letzten 100 Jahren, Leber und Niere als prä- bzw. postnatale Syntheseorte von Epo auszumachen, Epo zu isolieren und nach Identifikation und Klonierung des Gens rekombinant herzustellen, um es heutzutage unzähligen Anämiepatienten als Therapie zu verabreichen.

Darüber hinaus wurden einerseits in den letzten 15 Jahren die für die sauerstoffabhängige Regulation von Epo verantwortlichen Faktoren, insbesondere die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) identifiziert. Andererseits wurden die Signalwege, die Epo über seinen Rezeptor (EpoR) initiiert, um letztendlich durch Inhibition der Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen die Erythropoiese zu stimulieren, aufgeklärt (Jelkmann et al., 2007).

Jüngsten Ergebnissen zufolge werden Epo und der EpoR aber nicht nur von erythroiden, sondern ebenso von neuronalen Zellen exprimiert. Vermittelt über den EpoR hemmt Epo auch die Apoptose dieser Zellen. Dabei scheinen sich sowohl die neuronale Epo-Expression von der in Niere und Leber (Chavez et al., 2006) als auch die neuronale Epo-Funktion von der in erythroiden Zellen deutlich zu unterscheiden, sind aber noch nicht hinreichend geklärt (Shingo et al., 2001; Yu et al., 2002; Jelkmann et al., 2004).

Da sich die Retina aus dem Zwischenhirn entwickelt, stellt sie ein leicht zugängliches Modell dar, um die Expression und Funktion von Epo in neuronalen Geweben näher zu untersuchen.

Dazu wurde in bisherigen Studien insbesondere nachgewiesen, dass Epo retinale Zellen vor extern induziertem Zelltod wie Licht-induzierter Photorezeptor- und Axotomie-induzierter Ganglienzellapoptose schützt (Grimm et al., 2002; Kilic et al., 2005).

Die Bedeutung von Epo hinsichtlich physiologischer Apoptose in neuronalen Zellen, wie sie während der Retinaentwicklung auftritt, ist hingegen noch unzureichend untersucht.

## 1.1 Erythropoietin

### 1.1.1 Struktur, Expressionsorte und Abbau

Epo weist ein Molekulargewicht von 30,4kDa auf und setzt sich aus 4  $\alpha$ -Helixen zusammen. Epo wird der Zytokinfamilie der Hämatopoietine zugeordnet.

Das 165 Aminosäuren umfassende Herzstück des Glykoproteins genügt für die Bindung des EpoR und die Stimulation der Erythropoiese in vitro, während der Kohlenhydratanteil dieses vor dem Abbau schützt (Jelkmann, 2004). Die Epo-Menge wird konventionsgemäß in Units (U) angegeben, wonach 1U Epo dem Erythropoiese-stimulierenden Effekt von 5 $\mu$ mol Kobaltchlorid entsprechen.

Eine Besonderheit stellt der Expressionsort von Epo dar: Pränatal findet die Expression von im Blut zirkulierendem Epo hauptsächlich in hepatischen Zellen statt, bis diese um den Geburtszeitraum herum zunehmend und, speziesabhängig, circa sechs Wochen postnatal überwiegend (zu 85%) von peritubulären Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Nierenrinde übernommen wird (Dame et al., 1998; Maxwell et al.; 1993). Diese gewebe- und zeitspezifische Epo-Expression scheint dabei der Regulation durch gewebespezifische Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie zu unterliegen (Dame et al., 2004). Allerdings sind die genauen Mechanismen dieses Wechsels im Bildungsort noch immer nicht hinreichend verstanden. Beim Erwachsenen wird Epo darüber hinaus in kleinen Mengen auch in Milz, Lunge, Hoden und Gehirn exprimiert (Jelkmann, 2004). Die Elimination von Epo aus dem Blut erfolgt nur zu einem kleinen Teil durch Niere und Leber, hauptsächlich jedoch über die Bindung des EpoR und anschließender Internalisierung in die Zelle (Jelkmann, 2004).

### 1.1.2 Regulation der Expression

Gewebehypoxie (Sauerstoffmangel im Gewebe), allgemein definiert als Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung, ist als der stärkste Stimulus der Epo-Expression bekannt. (Jelkmann, 2004).

Die Ursachen für Hypoxie sind vielfältig und umfassen neben dem klassischen Beispiel der Anämie, die aufgrund des Hämoglobinmangels zu einer verminderten Sauerstoffkapazität des Blutes führt, auch einen verminderten Sauerstoffpartialdruck wie z.B. in großer Höhe und eine gesteigerte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wie z.B. bei CO-Vergiftung.

Die Tatsache, dass der erhöhten Epo-Konzentration im Blut ein ebenfalls exponentieller Anstieg der Epo-mRNS in den Nieren vorausgeht, zeigt, dass die Epo-Expression im Wesentlichen auf Transkriptionsebene reguliert wird. Dabei kann die Aktivität des 5'



gelegenen Promoters um Faktor 5, die des 3' Enhancers des Epo-Gens um Faktor 10 durch Hypoxie erhöht werden, und die gegenseitige Verstärkung dieser regulatorischen Sequenzen resultiert schließlich sogar in einer mehreren 100fachen Steigerung der Epo-Genexpression (Fandrey, 2004).

Im 3'Enhancer konnte das sogenannte Hypoxie-responsive Element (HRE) als eine Sequenz identifiziert werden, in deren Bereich die Bindung der regulierenden Transkriptionsfaktoren, insbesondere Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) und Hepatischer Nukleärer Faktor (HNF)-4, erfolgt. Das Heterodimer HIF und das Homodimer HNF-4, die an die HIF-Bindungsstelle (HBS) bzw. an das DR2-Element des HRE binden, werden über den Koaktivator p300/CREBP verknüpft und bilden dadurch ein Gerüst, das die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren und somit transkriptionelle Aktivität ermöglicht (Fandrey, 2004).

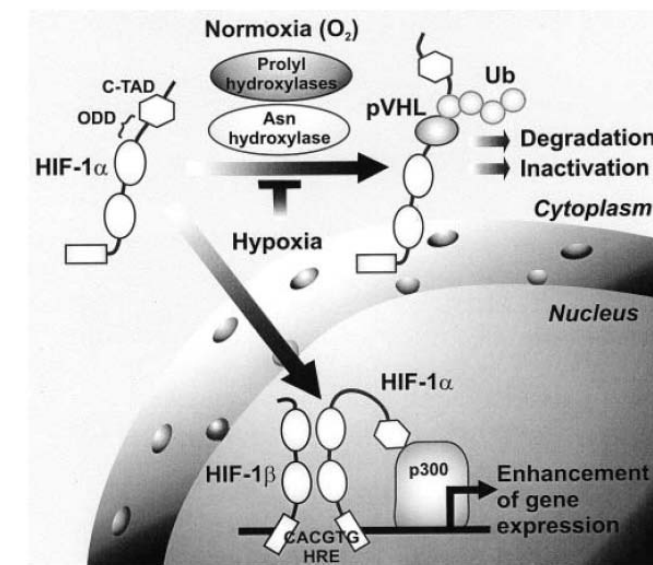
HIF, in diesem Zusammenhang gemeinhin als wichtigster Transkriptionsfaktor erachtet, setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammen, wobei von ersterer drei Subtypen (HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  und -3 $\alpha$ ) existieren und letztere auch als Aryl-Kohlenwasserstoff Nukleärer Translokator (ARNT) bekannt ist (Jelkmann, 2004).

Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert, aber während HIF-1 $\beta$  stets stabil im Zellkern vorliegt, wird HIF-1 $\alpha$  bei genügend hohem Sauerstoffpartialdruck, entsprechend Normoxie, unmittelbar ubiquitiniert, proteasomal abgebaut und ist somit nicht nachweisbar. Dieser Abbau unter Normoxie resultiert aus der Hydroxylierung des HIF-1 $\alpha$  durch eine Gruppe von Enzymen mit Prolylhydroxylaseaktivität, den so genannten PHDs 1, 2 und 3 (Prolylhydroxylase-Domäne-enthaltende Proteine), die zur Gruppe der  $\alpha$ -Oxoglutarat- und Fe(II)-abhängigen Dioxygenasen gehören. Die Hydroxylierung wird vollzogen, indem Sauerstoff, nach Bindung an das Fe(II)-Atom im aktiven Zentrum, gespalten wird und das eine O-Atom die neue Hydroxygruppe bildet, während das andere mit  $\alpha$ -Oxoglutarat unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> zu Succinat reagiert. Die durch die PHDs hydroxylierten Prolin-Reste 402 und 564 befinden sich dabei in den beiden sauerstoffabhängigen proteolytischen Degradationsdomänen (ODD) (Jelkmann, 2004).

Ihre Hydroxylierung ermöglicht die Markierung von HIF-1 $\alpha$  durch das von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL), die dann schließlich zur Ubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin Ligase und zur proteasomalen Degradation von HIF-1 $\alpha$  führt (Wenger, 2002).

Nur unter Hypoxie unterbleibt die initiale Hydroxylierung, so dass HIF-1 $\alpha$  in den Kern translozieren, dort akkumulieren und nach Heterodimerbildung mit HIF-1 $\beta$  im Bereich der HBS des Epo-Gens binden kann (Wenger, 2002).

Zur Entfaltung der transkriptionellen Aktivität sind allerdings weitere Kofaktoren, insbesondere p300/CREBP, essenziell, die über die beiden C- und N-terminal gelegenen sogenannten trans-aktivierenden Domänen (TAD-C bzw. TAD-N) der  $\alpha$ -Untereinheit mit HIF interagieren. Die Aktivität der TAD-C ist jedoch nur unter Hypoxie nachzuweisen, da sie in besonderem Maße von der Aminosäure Asparagin 803 abhängt, die unter Normoxie von einer Asparagylhydroxylase namens HIF-inhibierender Faktor (FIH-1) hydroxyliert wird und somit nicht für die Bindung des Koaktivatorproteins p300/CREBP zur Verfügung steht (Fandrey, 2004).



*Abb. 1:*

***Vereinfachtes Schema der HIF-1 $\alpha$ -Degradation unter Normoxie und HIF-1 $\alpha$  – Akkumulation unter Hypoxie. Aus Jelkmann, 2004.***

Zusammenfassend wurden demnach die PHDs und FIH-1 als Sauerstoffsensoren identifiziert, die HIF-abhängig nicht nur die Expression von Epo, sondern vieler weiterer sauerstoffabhängiger Gene wie die des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und der Stickstoffmonoxidsynthese regulieren (Fandrey, 2004).

HIF-2 $\alpha$  wird analog zu HIF-1 $\alpha$  reguliert und bildet mit HIF-1 $\beta$  das HIF-2 Dimer. HIF-1 und HIF-2 weisen gemeinsame (z. B. VEGF), aber auch eigene Zielgene auf. Dabei ist noch nicht hinreichend geklärt, ob Epo HIF-1 oder HIF-2 abhängig exprimiert wird. Es steht die Hypothese einer Gewebespezifität im Raume, nach der Epo in Niere und Nervensystem, im Gegensatz zur Leber, HIF-2 abhängig reguliert zu sein scheint (Jelkmann, 2004; Gruber et al., 2007).

Darüber hinaus bleibt aber zu bedenken, dass weitere Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Aktivität des Epo-Gens unabhängig von HIF beeinflussen können, wie z.B. GATA-2 diese durch Bindung an den Promoter unter Normoxie herabsetzt (Imagawa et al., 1997).

### 1.1.3 Mechanismen der Funktion

Die hauptsächliche Funktion von Epo besteht in der Stimulation der Erythropoiese mittels Protektion erythroider Progenitorzellen im Knochenmark vor Apoptose. Die normalerweise niedrige Epo-Konzentration im Blut ermöglicht es wenigen Vorläuferzellen zu überleben, während hingegen der Großteil dieser Zellen den programmierten Zelltod stirbt. Dabei reagieren die Zellen im Stadium der Colony-forming Units-erythroid (CFU-E) am sensitivsten auf den Einfluss von Epo, da sie die höchste Dichte an EpoR aufweisen (Jelkmann, 2004).

Der EpoR, ein 484 Aminosäuren langes Glykoprotein, gehört zur Superfamilie der Zytokin-Klasse I Rezeptoren und stellt sich als Transmembranrezeptor dar. Er setzt sich demnach aus einer hydrophoben Transmembransequenz, einem zytoplasmatischen sowie einem extrazellulären Abschnitt zusammen. Der zytoplasmatische Anteil des EpoR weist u. a. eine negativ regulierende Domäne und eine Serin-reiche Signal-Transduktionsdomäne auf. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Subdomänen, die je sieben  $\beta$ -Faltblätter enthalten, wobei die Struktur der distalen Subdomäne durch aus vier konservierten Cysteinresten gebildeten Disulfidbrücken stabilisiert wird. Das WSXWS- (Trp-Ser-X-Trp-Ser; X steht für jede beliebige Aminosäure) Motiv der distalen Subdomäne scheint essenziell für die Bindung von Epo zu sein. (Youssofian et al., 1993).

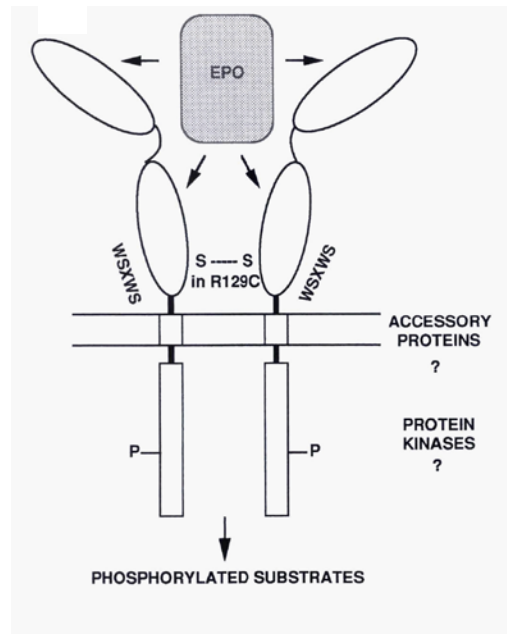


Abb. 2:

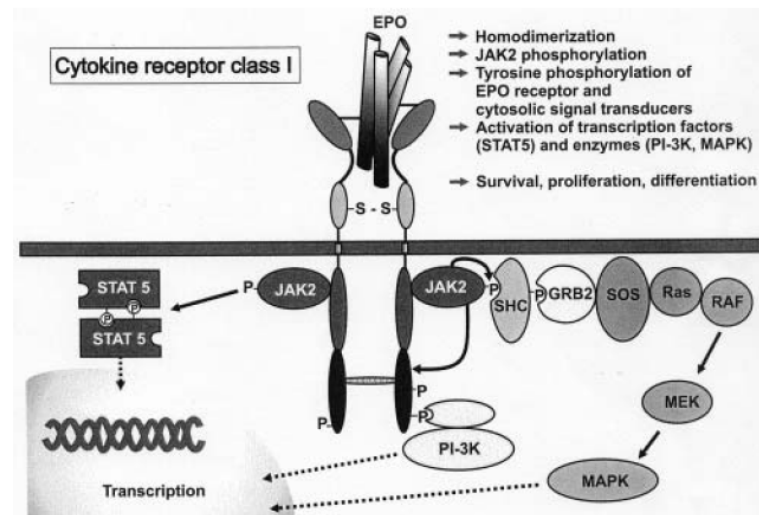
**Hypothetisches Modell des Epo-Rezeptor-Komplexes.** Aus Youssoufian et al., 1993.

Ein einziges Epo-Molekül bindet an die extrazellulären Domänen eines Epo-Rezeptor-Dimers. Die Bindung von Epo führt zur Phosphorylierung des Rezeptors und von Signalmolekülen.

Zwei EpoR bilden ein Homodimer, das von einem einzigen Epo-Molekül gebunden wird. Die Bindung des Liganden an die extrazellulären Domänen der beiden Rezeptormoleküle induziert eine Konformationsänderung, bei der insbesondere die intrazellulären Domänen verstärkt dimerisieren und führt zur Phosphorylierung sowohl des EpoR als auch zusätzlicher Substrate (Youssoufian et al., 1993). Insbesondere zwei Janus Kinasen 2 (JAK2), Tyrosin Kinase Moleküle, werden durch diese Phosphorylierung aktiviert und die zahlreichen phosphorylierten Tyrosinreste des EpoR stellen Andockstellen für weitere Signalproteine dar. Durch diese Vorgänge werden verschiedene Signalwege gebahnt, zu denen Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI-3K/Akt), JAK2, Signal Vermittler und Transkriptions-Aktivator 5 (STAT5), Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) sowie Proteinkinase C gehören (Jelkmann, 2004). Die Signalkaskade resultiert dann in der Induktion von Genen, die das Überleben der erythroiden Progenitorzelle fördern.

Der Epo/EpoR-Komplex wird von der Zelle internalisiert und die angestoßene Signalkaskade wird innerhalb von 30 bis 60 min durch die hämopoietische

Zellphosphatase (HCP) mittels Dephosphorylierung von JAK2 und des Rezeptors wieder beendet (Jelkmann, 2004).



*Abb. 3:*

*Vereinfachtes Schema der Epo-Signalkaskade. Aus Jelkmann, 2004.*

#### 1.1.4 Expression und Funktion von Epo in neuronalen Zellen

Neuerdings wurde der EpoR auch auf nicht erythroiden Zellen nachgewiesen. Unter anderem exprimieren endotheliale, renale, epi- und perikardiale, plazentäre, pankreatische und neuronale Zellen EpoR, was die Vermutung nahe legt, dass Epo zusätzlich angiogenetische und neurotrophe Funktionen erfüllt (Jelkmann, 2004).

Allerdings ist die Bedeutung der Expression und Funktion von Epo in diesen Geweben noch nicht hinreichend geklärt. So scheinen transgene Mäuse, die EpoR ausschließlich in hämatopoietischen Zellen exprimieren, sich normal zu entwickeln, fertil zu sein und insbesondere keine neurologischen Defizite aufzuweisen (Suzuki et al., 2002). Andererseits konnte in unabhängigen Studien nachgewiesen werden, dass Epo neuronale Zellen vor exogen induziertem Zelltod schützt (Brines et al., 2000; Grimm et al., 2004; Weishaupt et al., 2004) und auch während der Embryonalentwicklung des Gehirns neuronale Progenitorzellen vor Apoptose bewahrt (Chen et al., 2007).

Schließlich wird Epo inzwischen auch in klinischen Patientenstudien getestet, in denen Schlaganfallpatienten Epo zur Neuroprotektion erhalten und Epo die Infarktgröße im Vergleich zum Placebo reduziert (Ehrenreich et al., 2002).

Gleichwohl ist noch immer nicht geklärt, inwiefern Epo die Bluthirnschranke überwinden kann, oder ob lokal von neuronalen bzw. Gliazellen exprimiertes Epo maßgeblich für die neurotrophen Effekte verantwortlich ist. Mutmaßlich über die Vermittlung von auf Hirnkapillaren und Astrozytenpodien befindlichem EpoR soll 1% des systemischen Epos in den Liquor gelangen (Eid et al., 2002) und ebenso wie von Neuronen und Astrozyten lokal exprimiertes Epo (Chavez et al., 2006) neuroprotektiv wirken können. Welche neuronalen Zelltypen genau für die Epo-Expression verantwortlich sind, ist bisher aber unklar geblieben.

Auch die in neuronalen Zellen durch Epo aktivierten Signalwege sind nicht zu 100% mit denen in erythroiden Zellen identisch und diesbezügliche Studien liefern widersprüchliche Ergebnisse. In einem Modell von Axotomie-induziertem retinalem Zelltod wurde PI3-K/Akt als prädominant (Weishaupt et al., 2004), in einem retinalem Diabetesmodell hingegen ERK-1/-2 (p42-/p44-MAP-Kinase) als vorherrschend identifiziert und kein Beleg für eine STAT5-Beteiligung gefunden, wie sie für eine EpoR-Aktivierung typisch wäre (Zhang et al., 2008). Erste Schlussfolgerungen ergaben, dass die Signalkaskade Zelltodstimulus abhängig sein könnte (Samardzija et al., 2006).

In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, ob die neuroprotektive Wirkung von Epo über den klassischen homodimeren EpoR vermittelt wird (Yu et al., 2002) oder ob Epo in neuronalen Geweben nicht an ein Heterodimer aus EpoR und dem gemeinsamen  $\beta$ -Rezeptor ( $\beta$ cR), der zusammen von Interleukin (IL) 3 und 5 sowie Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) genutzen Signaltransduktionsuntereinheit, bindet (Brines et al., 2004).

Zusammenfassend legen die bisher veröffentlichten Studien zur Erforschung der Neuroprotektivität von Erythropoietin in neuronalem Gewebe ihren Fokus auf exogen induzierten Zelltod oder beschränkten sich auf die Embryonalentwicklung. Im Rahmen dieser Dissertation wird hingegen erstmals die Funktion von Epo im Kontext physiologisch auftretender, postnataler Apoptose untersucht, für die die Retinaentwicklung der Maus ein sehr gut geeignetes Modell darstellt.

## **1.2 Die Retinaentwicklung der Maus als Modell physiologischer Apoptose von Nervenzellen**

### **1.2.1 Mechanismen der Apoptose**

Apoptose als programmierter Tod der Zelle bezeichnet, stellt ein weit verbreitetes physiologisches Phänomen während der Entwicklung aber auch im erwachsenen Organismus dar (Vecino et al., 2004). Als Beispiele für die Bedeutsamkeit der Apoptose wären die Entfernung interdigitalen Gewebes bei der Bildung von Fingern und Zehen (Sadler, 2004), die holokrine Talgdrüsensekretion, die Selektion von Keim- und Immunzellen sowie die Elimination entarteter Zellen zu nennen. Insbesondere für die Entwicklung des Nervensystems spielt Apoptose eine entscheidende Rolle. So sterben über die Hälfte der zuvor entstandenen Nervenzellen noch während der Ontogenese den programmierten Zelltod (Vecino et al., 2004).

Apoptose und Nekrose werden gemeinhin als gegensätzliche Arten von Zelltod verstanden. Apoptose auf der einen Seite ist charakterisiert als Zelltod, der mittels Kondensation des nukleären Chromatins, Zerteilen der DNS in gleichmäßige Fragmente und Schrumpfung des Zellsomas verläuft und in der Fragmentierung der Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) unter Erhaltung der Zellmembranintegrität resultiert. Diese Zellreste werden dann vor allem von Makrophagen anhand der veränderten Zusammensetzung ihrer Zellmembran erkannt und phagozytiert, bevor Zellbestandteile nach außen gelangen können, wodurch jegliche inflammatorische Reaktion des umliegenden Gewebes verhindert wird (Bruce, 2004).

Dahingegen stellt sich auf der anderen Seite Nekrose als ein Prozess dar, der mit einer frühen Schwellung der Zellen und einer Zerstörung der Zellmembran einhergeht und durch das Austreten von Zellbestandteilen eine ausgedehnte Entzündung des umliegenden Gewebes nach sich zieht (Bruce, 2004).

Allerdings sind Apoptose und Nekrose vielmehr als extreme Phänomene des Zelltods zu verstehen, der sich in aller Regel als Mischform dieser beiden vollzieht und dessen Ablauf maßgeblich von der verfügbaren Energie der Zelle abhängt. Bei guter Energieversorgung begeht die Zelle eher Apoptose, wo hingegen ein Substratmangel zur Nekrose führt (Vecino et al., 2004).

Eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Apoptose nehmen die so genannten Caspasen, eine Familie von Proteasen, ein, die eine Cysteingruppe in ihrem aktiven Zentrum aufweisen und Proteine an spezifischen Aspartatresten erkennen und spalten. Dabei liegen sie zunächst als Procaspasen vor und müssen selbst durch Spaltung an einem solchen

Aspartatrest durch andere Caspasen in ihre aktive Form überführt werden. Somit lassen sich Initiator- (wie z.B. Caspase-8, -9, -10 und -12) von Effektorcaspasen (wie z.B. Caspase-3, -6, und -7) unterscheiden, wobei erstere zur Aktivierung letzterer zuständig sind. Die Effektorcaspasen setzen dann schließlich die für die Apoptose typischen ultrastrukturellen Veränderungen in Gang, indem sie zelluläre Proteine durch Spaltung inaktivieren, die für den Erhalt der Zellfunktion essentiell sind, wie z. B. Strukturproteine des Zytoskeletts und DNS-Reparaturenzyme, und andere, wie z.B. DNAsen, die die DNS-Fragmentation durchführen, aktivieren (Vecino et al., 2004).

Bezüglich der Auslösung der Apoptose lässt sich ein extrinsischer von einem intrinsischen Weg unterscheiden. Während erstgenannter durch extrazelluläre Signale wie Tumor Nekrosefaktor (TNF) und Fas Ligand (FasL) oder durch einen Mangel an trophischen Faktoren initiiert wird, setzen DNS-Schäden und Stress des Endoplasmatischen Retikulums die Apoptose intrazellulär in Gang (Vecino et al., 2004).

Endoplasmatischer Stress aktiviert dabei die Initiatorcaspase-12, TNF und FasL die Initiatorcaspasen-8, -9 und -10, und DNS-Schäden und Wachstumsfaktormangel resultieren ebenfalls in Caspase-9-Aktivierung. Die Kontrolle der Caspase-9 ist demnach ein zentraler, komplex regulierter Prozess, in dessen Mittelpunkt das Mitochondrium steht. Wird nämlich Cytochrom c aus diesem freigesetzt, bildet sich das so genannte Apoptosom, ein Komplex aus Cytochrom c, Adenosin Triphosphat (ATP), Apoptose Protease-aktivierendem Faktor (Apaf)-1 und Procaspase-9, das zur Spaltung und Aktivierung letzterer führt. Die Freisetzung von Cytochrom c hängt dabei kritisch von der Permeabilität der Mitochondrienmembran ab, die wiederum durch die Familie der Bcl-2 Proteine beeinflusst wird. Dimere bestehend aus anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2, fördern, Dimere aus proapoptotischen Mitgliedern wie z.B. Bax, Bad, Bid und Bim stören hingegen durch Kanalbildung die Integrität der Mitochondrienmembran. Das Verhältnis von anti- zu pro-apoptotischen Bcl-2 Mitgliedern stellt demnach eine wichtige Schaltstelle im Apoptosegeschehen dar (Vecino et al., 2004). Nach heutigen Erkenntnissen beruht also die pro- oder antiapoptotische Wirkung eines Faktors auf seinem Einfluss auf die Regulatoren der Apoptosekaskade.



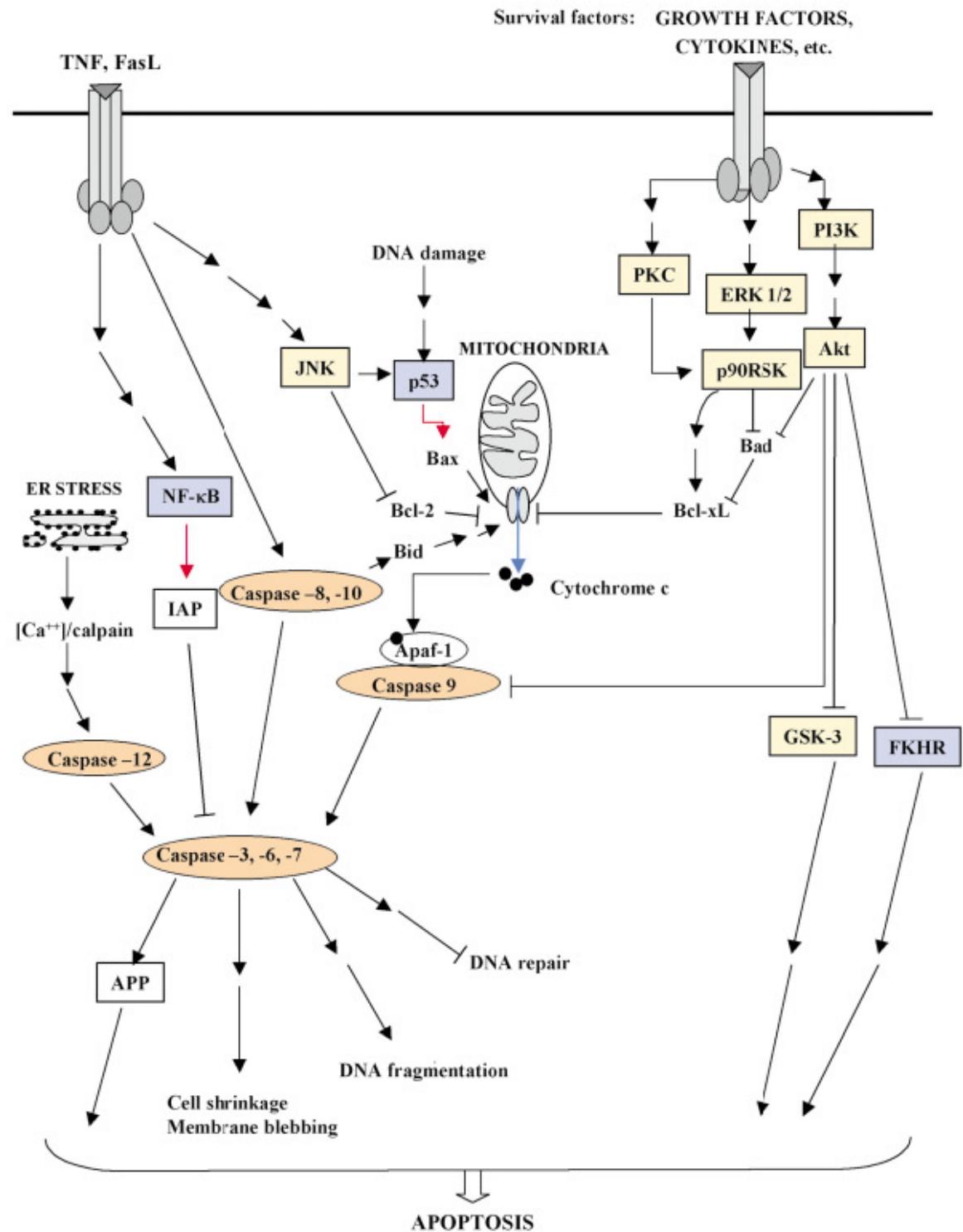


Abb. 4:

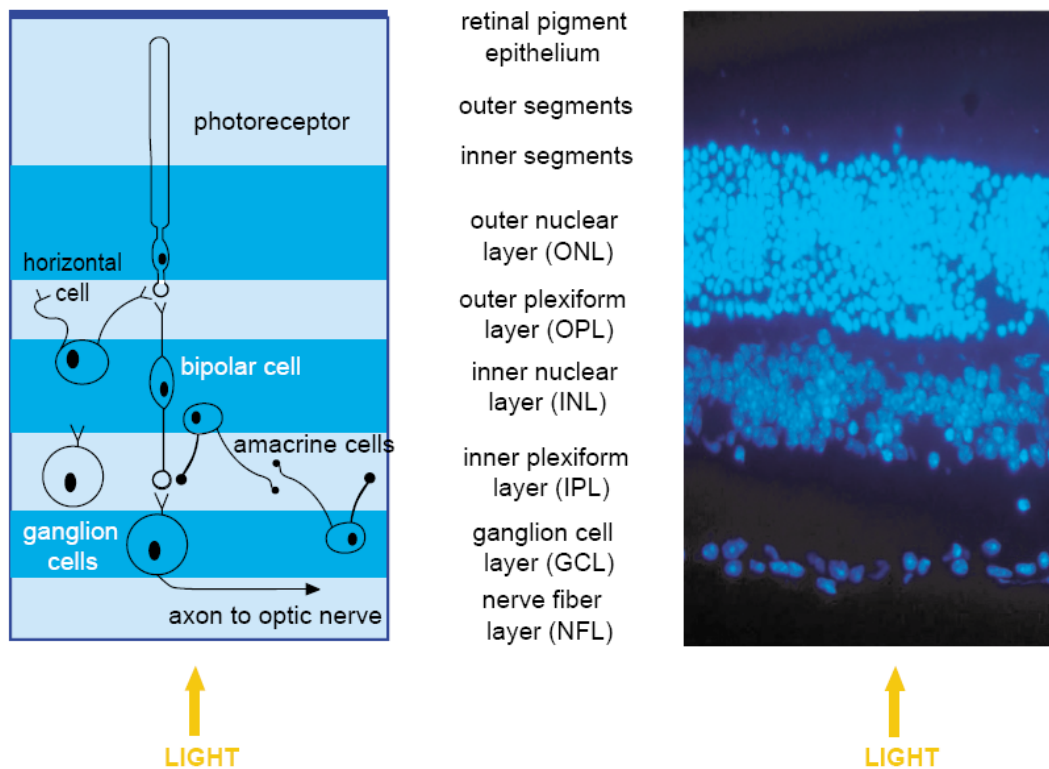
Typische Signalwege, die zu Apoptose oder Zellüberleben führen. Aus Vecino et al., 2004.

### 1.2.2 Retinaentwicklung und -aufbau

Die Retina ist ontogenetisch ein Abkömmling des Zwischenhirns. Aus dem noch nicht geschlossenen Vorderhirn treten auf jeder Seite zwei flache Furchen auf, die mit dem Neuralrohrschluss zu Ausbuchtungen werden und dann als sogenannte Augenbläschen dem Oberflächenektoderm anliegen. In diesem induziert das Augenbläschen daraufhin die Entstehung der Linsenplakode, bevor es sich einstülpt, um den doppelwandigen Augenbecher zu bilden, der über den Augenbecherstil mit dem Vorderhirn verbunden bleibt. Während aus dem Oberflächenektoderm Linse und Hornhaut hervorgehen, entwickelt sich aus der äußeren Schicht des Augenbechers das Pigmentepithel der Retina und aus der inneren Schicht die Retina selbst. Dazu bilden die Neuroepithelzellen der inneren Schicht des Augenbechers, wie im gesamten Zentralnervensystem, eine äußere Mantelschicht und eine innere Marginalzone aus. Die Marginalzone enthält dabei die Axone der Nervenzellen, die sich, ebenso wie die Sinnes- und Stützzellen in der Mantelschicht entwickeln. Die Sinnesrezeptoren entstehen aus einem Zilium-ähnlichen Zellfortsatz der Sinneszellen und sind dem Pigmentepithel zugewandt (Sadler, 2003).

Die retinalen Zelltypen entwickeln sich nacheinander in einer festen zeitlichen Reihenfolge: zunächst formen sich die Ganglienzellen, bei Nagern circa ab dem 10. Embryonaltag, dann folgen die Zapfen und die Horizontalzellen, bevor schließlich die Amakrinzellen und die Stäbchen ab dem 16. Embryonaltag entstehen, und die Bipolar- und Müllerzellen ab der Geburt folgen (Shankland und Macagno, 1992). Aus den Ganglienzellen sprossen Axone aus, die die Retina durchbrechen und im Augenbecherstil schließlich als Nervus opticus zum Großhirn verlaufen (Sadler, 2003).

Der Aufbau der Netzhaut umfasst nach Abschluss der Entwicklung folgende Strukturen: die Äußere Körnerschicht, die die Zellkerne der Stäbchen und Zapfe enthält, deren Sinnesrezeptoren dem Pigmentepithel anliegen, die Äußere Plexiforme Schicht, in der die Synapsen zwischen den Photorezeptorzellen und den Bipolarzellen sowie Horizontalzellen liegen, dann die Innere Körnerschicht mit den Bipolarzellen, die Innere Plexiforme Schicht mit den Amakrinzellen und den Synapsen von Bipolar- und Ganglienzellen und schließlich die Ganglienzellschicht, die von der Inneren Gliagrenzmembran (Endfüßchen der Müllerzellen und eine Basalmembran) begrenzt wird.



**Abb. 5:**  
**Aufbau der Retina.** Aus Guérin et al., 2006.

### 1.2.3 Apoptose während der Retinaentwicklung der Maus

Die adäquate Entwicklung eines Gewebes hängt maßgeblich von dem Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -tod ab. Auch im Falle der Reifung des zentralen Nervensystems, und somit auch der Retina, stellt sich Apoptose als ein bedeutsames Phänomen dar. Die Entstehung der mehrschichtigen Retina mit differenzierten Neuronen aus einem unreifen einschichtigen Neuroepithel vollzieht sich über eine exzessive Neurogenese auf der einen und einer gezielten Elimination von Neuronen mittels Apoptose auf der anderen Seite (Guérin et al., 2006).

Die Retinaentwicklung der Maus ist, abgesehen von einer embryonalen Zelltodphase am Embryonaltag (E) 10.5, im Wesentlichen während der ersten drei Wochen nach der Geburt von Apoptose geprägt. Insgesamt konnten drei Zelltodphasen an den postnatalen Tagen (P) 2, 9 und 15 identifiziert werden. Dabei sind an P2 die Vorläufer der späteren Ganglienzellen in der Inneren Neuroblastenschicht von Apoptose betroffen, während an P9 apoptotische Zellen hauptsächlich in der Inneren Körnerschicht auszumachen und am ehesten als Amakrinzellen zu charakterisieren sind. Der letzte Anstieg an apoptotischen Zellen lässt sich schließlich an P15 in Ganglien- und Photorezeptorzellschicht verzeichnen (Péquignot et al., 2003).

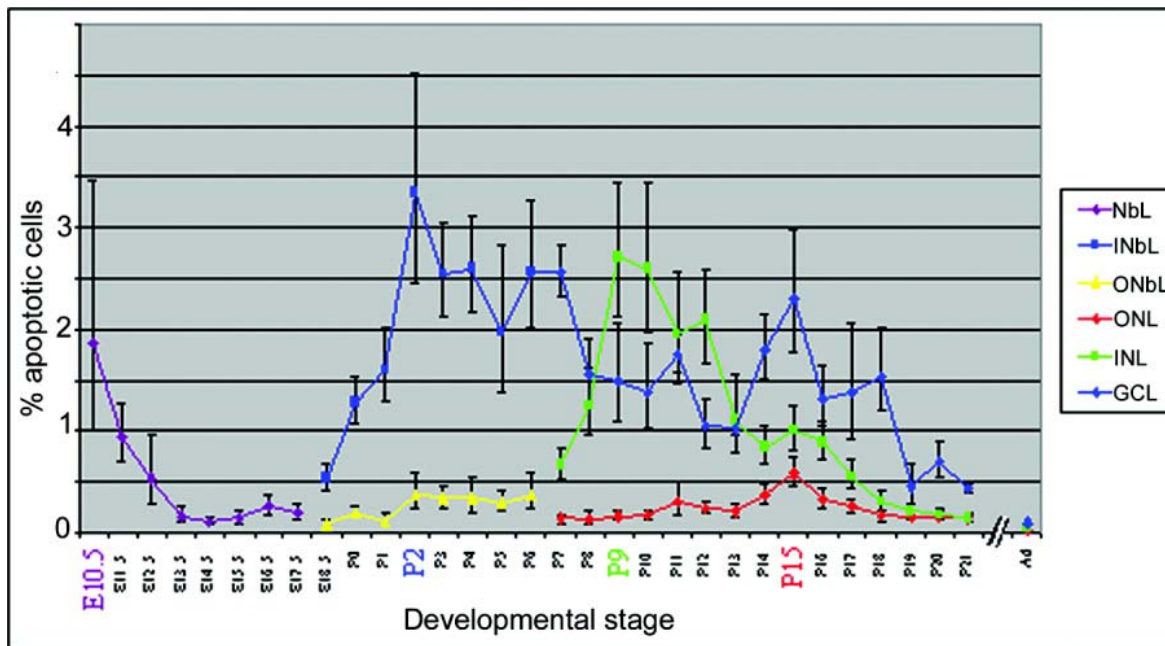


Abb. 6:

**Zelltodphasen in der Entwicklung der C57BL/6J Mausretina.** Aus Péquignot et al., 2003.

NbL: Neuroblastenschicht (innere Schicht des Augenbechers); INbL: Innere Neuroblastenschicht (Vorläufer der Ganglienzellschicht); ONbL: Äußere Neuroblastenschicht (Vorläufer von Innerer und Äußerer Körnerzellschicht); ONL: Äußere Körnerzellschicht; INL: Innere Körnerzellschicht; GCL: Ganglienzellschicht.

Dabei scheinen vor allem solche Zellen von Apoptose betroffen zu sein, die nicht in der Lage sind, geeignete Synapsen zu bilden, da elektrische Impulse durch die Aktivierung intrinsischer Mechanismen das Überleben von Neuronen, aber auch von Gliazellen entscheidend fördern (Vecino et al., 2004).

Außerdem wird nach der Neurotrophe-Faktor-Hypothese postuliert, dass ein relativer Mangel an neurotrophen Faktoren, hervorgerufen durch eine zu große Zellanzahl, diese limitiert (Vecino et al., 2004). Neurotrophine werden in der Retina und in den primären visuellen Zentren exprimiert, um Überleben, Differenzierung und Regeneration der Neurone auf auto-, para- und endokrinem Weg zu steuern. Zu den bedeutendsten für die Netzhautentwicklung zählen der Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), der Nervenwachstumsfaktor (NGF) sowie die Neurotrophine (NT) -3, -4, -5, -6 und -7, die spezifisch die Rezeptorfamilie der Tyrosinkinasen (Trk), bekannt als Trk A, B und C und mit geringer Affinität den NGF-Rezeptor binden (Guérin et al., 2006). Des Weiteren konnte extrapancreatisches Insulin als neurotrophen Agens während der Retinaentwicklung charakterisiert werden (Vecino et al., 2004; Dünker et al., 2005).

Über die Neurotrophe-Faktor Hypothese hinausgehend wurden zunehmend auch Faktoren identifiziert, die im Gegensatz zu den Neurotrophen vielmehr Apoptose in neuronalen Vorläuferzellen auslösen. Im Speziellen seien die Mitglieder der Transformierende-Wachstumsfaktor (TGF)  $\beta$  Superfamilie, TGF- $\beta$  und Knochenwachstumsfaktor (BMP) 4, genannt. Diese Faktoren signalisieren über Typ-I Rezeptoren, auch Aktivin-ähnliche Kinasen (ALK) bezeichnet, und über Typ-II Rezeptoren, wobei die Bindung des Liganden an den Typ-II Rezeptor den Typ-I Rezeptor rekrutiert und der Typ-I Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert wird. TGF- $\beta$  verwendet dabei die TGF- $\beta$ -Rezeptoren I (ALK1 und 5) und den TGF- $\beta$ -Rezeptor II, während BMP die BMP-Rezeptoren Ia (ALK3) oder Ib (ALK6) und den BMP-Rezeptor II bindet. In der anschließenden Signalkaskade spielen dabei die so genannten Smad-Proteine eine zentrale Rolle, die schließlich in den Kern translozieren, um dort selbst an die DNS zu binden oder über Kofaktoren die Transkription ihrer Zielgene zu beeinflussen (de Caestecker, 2004; Duenker, 2005).

So konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  während aller postnatalen Zellstadien der murinen Retina, unter anderem durch eine Expressionsverminderung von Bcl-2, Apoptose in Ganglienzellen oder deren Vorläufern induzieren kann (Dünker et al., 2005; Beier et al., 2006). Zusätzlich gelang der Nachweis einer synergistischen Interaktion von TGF- $\beta$  und BMP4 in der Vermittlung von retinalem Zelltod in der Inneren Neuroblastenschicht an P2, die sich insbesondere auf der Ebene der Smad-Proteine vollzieht (Franke et al., 2006).

Demnach werden die Zellstadien während der Entwicklung der murinen Retina nicht allein durch die Ausbildung von Synapsen und die Menge an Neurotrophen moduliert, sondern stellen sich vielmehr als das Ergebnis einer komplexen Interaktion von anti- und proapoptotischen Faktoren dar, die zeit- und zellspezifisch ihre Wirkung entfalten und somit einen bedeutenden Beitrag zu einer adäquaten Retinaentwicklung leisten (Dünker et al., 2005).

### **1.3 Ziel der Dissertation**

Existierte früher die allgemeine Annahme, Epo wirke ausschließlich auf erythroide Vorläuferzellen, so mehrten sich in den letzten Jahren im Rahmen zahlreicher Studien die Hinweise darauf, dass Epo ein viel größeres Spektrum an Zielzellen und verschiedenen Funktionen zu bieten hat.

Bezüglich des Nervensystems wissen wir heute, dass Epo dort lokal exprimiert wird und protektiv agiert. Diese Erkenntnisse entstammen überwiegend Untersuchungen, in denen neuronaler Zelltod mittels exogener Stimuli ausgelöst wurde, wie z.B. Ischämie oder oxidativer Stress (Digicaylioglu und Lipton, 2001). Dies gilt auch für die Studien, die sich der Retina als Modell für das Nervensystem bedienten. So ist inzwischen erforscht, dass Epo Photorezeptorzellen vor Licht-induzierter Apoptose bewahrt (Grimm et al., 2002; Grimm et al., 2005) und Ganglienzellen vor dem Tod durch oxidativen Stress (Yamasaki et al., 2005) und Substratdeprivation (Chavez et al., 2006) schützt.

Wenig bekannt ist allerdings immer noch über die physiologische Funktion von Epo im Nervensystem, wie sie während der Entwicklung von Bedeutung sein könnte. Nur sehr wenige Autoren untersuchten bisher die Wirkung von Erythropoietin während der Embryonalentwicklung des Gehirns und zeigten, dass Epo die Apoptose in neuronalen Progenitorzellen reduzieren kann (Yu et al., 2002; Chen et al., 2007).

In dieser Dissertation wird demnach erstmals die Expression und Wirkung von Epo während der postnatalen Entwicklung des Nervensystems näher erforscht. Dazu wird die Retina, ein einfach erreichbarer und überschaubarer Teil des Zentralnervensystems, als Modell verwendet und ihre Entwicklung in den ersten drei Wochen nach der Geburt hinsichtlich folgender Aspekte untersucht:

Zunächst soll der Nachweis einer lokalen Expression von Epo in der sich entwickelnden Retina erbracht und die verantwortlichen Zellen identifiziert werden.

Des Weiteren erfolgt der Vergleich des Expressionsmusters von Epo in der Retina mit dem in Niere und Leber, den klassischerweise Epo-exprimierenden Organen und die Betrachtung von HIF als zentralen Regulator der Epo-Expression in der Retina.

Im zweiten Teil stellt sich dann die Frage, ob Epo während der retinalen Zelltodphasen neuroprotektiv wirkt und welche Zellen in diesem Fall zu den Zielzellen gehören.

Dazu soll zunächst EpoR als Voraussetzung für eine Epo-Wirkung nachgewiesen werden. Um die Wirkung von Epo unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können, wird eine organotypische Kultur von Wholemound-Retinae verwendet, bei der die Zellkontakte

erhalten bleiben und die Kulturbedingungen somit als in-vivo nah bezeichnet werden können (de la Rosa et al., 1998).

Einen weiteren zu klärenden Punkt stellt die Interaktion von Epo mit anderen für die Retinaentwicklung bedeutsamen Faktoren dar, die beispielhaft anhand von Insulin als anti- und TGF- $\beta$  als proapoptotisches Agens betrachtet wird.

Die Aufklärung der Signalwege, die Epo in retinalen Zellen aktiviert, soll dann den Abschluss der Arbeit bilden.

Insgesamt ist es das Ziel der Dissertation, zu klären, ob Epo einen bedeutsamen Beitrag zu einer adäquaten postnatalen Retinaentwicklung leisten kann, und dabei zu helfen, die physiologische Funktion von Epo im Zentralnervensystem zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Geräte und Substanzen

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Brutschrank  
Hera cell, Heraeus Instruments
- Deckgläschen  
24x32mm, Engelbrecht
- ELISA-Reader  
Spectra Count, Packard
- Erhitzen  
60°C: HLC TM 130-6, Oehmen  
95°C: HLC HTM 130, Oehmen
- Geldokumentation  
Photo-Print IP-115.SD, LTF Labortechnik
- Glaspasteurpipetten, Brand
- Heparinkapillaren  
Einmalkapillarpipetten 20µl, Brand  
Mikrohämatokritkapillaren 50µl, Brand
- Homogenisator  
Polytron PT 20 OD, Kinematica
- Hypoxie-Brutschrank  
BB 6220 CUO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments  
Invivo<sub>2</sub> 400, Hypoxia Workstation
- Kühlzentrifugen  
Centrifuge 5415 R, Eppendorf  
Biofuge fresco, Heraeus Instruments  
Labofuge 400 R function line, Heraeus Instruments
- Fluoreszenzmikroskop  
NIKON ECLIPSE 1000, Nikon  
Objektive, Nikon      60x/1.2oil DIC H  
                                 40x/0.8w DIC M



- Filter, Photomed      DAPI: Anregung: 365/50; Detektion: 495/20  
                              CY3: Anregung: 535/50; Detektion: LP590  
                              FITC: Anregung: 500/20; Detektion: 545/25
- Fotokamera  
     Infiniti 2, Lumerera
- Lichtmikroskop, Leica
- Microplate Fluoreszenz Reader  
     FLX 800, Bio-Tek Instruments
- Netzgeräte  
     Power Pac 200, Bio-Rad  
     Power Pac 300, Bio-Rad  
     Power Pac 3000, Bio-Rad
- Objektträger  
     76x26x1mm, Engelbrecht
- PCR  
     Mastercycler personal, Eppendorf  
     Tpersonal, Biometra  
     Tprofessional, Biometra  
     DNA Thermal cycler, Perkin Elmer  
     Geneamp PCR system 9600, Perkin Elmer
- Photometer  
     SmartSpec 3000, Bio-Rad  
     Küvette: Quarz Spectrophotometer Cell Micro, 16.50-Q-10/8,5mm, Bio-Rad
- Pipetten  
     10µl, 100µl, 1000µl, Eppendorf  
     1000µl, Gilson
- Plastikschalen für Cryostatschnitte  
     Tissue-Tek Cryomold Standard, Miles
- Präparierbesteck, Fine Science Tools
- Reaktionsgefäße  
     0,5ml; 1,5ml; 2ml, Eppendorf
- real-time PCR  
     iCycler iQ 5, Multicolor Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad
- Rollschüttler

- Typ RM5, Karl Hecht KG
- RT-PCR
  - Mastercycler 5330 plus, Eppendorf
  - Tpersonal, Biometra
  - Tprofessional, Biometra
- Spritzen
  - 2ml, Becton Dickinson
  - Nadeln 26G x  $\frac{3}{4}$ , Becton Dickinson
- Sterile Werkbank
  - Hera safe, Heraeus Instruments
- Sterilisationsaufsätze
  - Steritop, 0,22µm Porengröße, Millipore
- Superfrostobjektträger
  - Superfrost Plus 25x75x1mm, Langenbrinck
- Schwenkschüttler
  - Polymax 1040, Heidolph Instruments
- Tischzentrifugen
  - Centrifuge 5415 D, Eppendorf
  - Biofuge pico, Heraeus Instruments
- Vortex Mixer, Scientific Industries
- Western-Blot
  - Mini Protean 3, Bio-Rad
  - Nitrocellulose-transfer-membrane, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell
  - Gel-blotting-Papiere, GB003, Schleicher & Schuell
  - Röntgenfilme, Agfa
- Zellkulturplatten
  - 6, 24 und 96 Vertiefungen, 6 Vertiefungen Petri-Perm, Greiner Bio-one
- Zellzentrifuge
  - Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge, Thermo Fisher Scientific

### 2.1.2 Substanzen

#### Chemikalien

- apo-Transferrin human (Sigma-Aldrich)
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Collagenase from Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich)
- Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation)
- Dako Cytomation Pen (Dako Cytomation)
- DePeX Eindeckmedium (Serva)
- 2'4' Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Sigma-Aldrich)
- Diaminobenzidin (DAKO)
- Diethylpyrocarbonate (Sigma)
- DNase I (Roche)
- Drabkin'sche Lösung (0,5g Natriumbikarbonat, 100mg Kaliumferricyanid, 25mg Kaliumcyanid in 500ml Aqua dest.)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium, F-12 Ham (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Erythropoietin, rekombinant, human, (Boeringer Ingelheim)
- Gentamicin (10mg/ml), liquid (Invitrogen)
- Glycin (Carl-Roth)
- Guanidiniumthiocyanat (Carl-Roth)
- HBSS (10X), liquid (Invitrogen)
- Hyaluronidase from bovine testes (Sigma-Aldrich)
- Instant Haematoxylin (Shandon Thermo)
- Insulin, rekombinant (Sigma)
- L-Glutamine 200mM (100X), liquid (Invitrogen)
- Natriumazid (Merck)
- Natronlauge (Carl-Roth)
- Normal Goat Serum (Invitrogen)
- Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich)
- Phenol solution (Sigma-Aldrich)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- Progesterone (Sigma-Aldrich)

- Putrescine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)
- Silikon Lösung Serva in Isopropanol (Serva Elektrophoresis)
- Sodium selenite (Sigma-Aldrich)
- Tissue Tek, O.C.T Compound (Sakura)
- Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ , rekombinant, human (R&D Systems)
- Triton X-100 (Carl-Roth)
- Trypsin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich)
- Wasserstoffperoxid (Sigma)
- Xylol (Riedel de Haen)

Reagenzien für die Kernextraktion, Proteinbestimmung und Western-Blot Analyse

- NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology)
- Protease Inhibitor  
Complete Mini, EDTA-free (Roche)
- DC Proteinassay Reagenz (BioRad)
- ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham)

Western Blot-Antikörper

- HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals)
- HIF-2 $\alpha$  (Novus Biologicals)
- STAT-5 (Cell signaling)
- phospho STAT-5 (Cell signaling)

RT-Reagenzien, PCR-Primer und –Zusätze

- Reverse Transkriptase (Promega)
- RT-5 $\times$ Puffer (Promega)
- Oligo dT (Invitrogen)
- alle Primer (Invitrogen)
- NTPs (Qiagen)
- Taq Polymerase (Invitrogen)
- 10 $\times$ PCR-Puffer (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 100 kb DNA Ladder (Invitrogen)
- qPCR MasterMix Plus for Cyber Green I (Eurogentec)

#### Caspase Assay

- Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega)

#### Epo-ELISA

- Mouse/Rat Erythropoietin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)

#### Antikörper für die Immuncytochemie

- mouse anti-Brn3a polyklonaler Antikörper (Chemicon)
- mouse anti-Op sin polyklonaler Antikörper (Sigma-Aldrich)
- goat biotinylated anti-mouse IgG Sekundärantikörper (Molecular Probes)
- CY3-conjugated Streptavidin (Molecular Probes)
- FITC-conjugated Streptavidin (Molecular Probes)

#### Antikörper für die Immunhistochemie

- rabbit anti-GFP polyklonaler Antikörper (Molecular Probes)
- Merrettich-Peroxidase-konjugierter anti-rabbit IgG Sekundärantikörper (Biosource)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation von Wholemout-Retinae und ihre organotypische Kultur

Nach fachgerechter Tötung der C57BL/6J Mäuse (Jackson Laboratory), im Alter von zwei, neun oder fünfzehn Tagen postnatal, wurden die Augen mit Hilfe einer gebogenen Pinzette aus der Orbita herausgelöst und in PBS gelegt. Bei der anschließenden Retinapräparation wurden nacheinander, unter Verwendung zweier geraden Pinzetten, der Sehnerv, das Pigmentepithel, die Linse, der Glaskörper und das Gefäßgeflecht entfernt, ohne die Retina dabei zu beschädigen, um somit eine Induktion von Apoptose zu vermeiden. Anschließend wurden die Wholemouts mit 0,5 mg/ml Hyaluronidase in je 100µl Dulbecco's Modified Eagle's (DME)-Medium für 15 min bei 37°C auf einer 96-Lochplatte vorinkubiert, um die Innere Gliagrenzmembran (Stratum limitans internum) der Retina für die später applizierten Faktoren besser durchgängig zu machen. Die Kultivierung der Wholemouts erfolgte in je 2 ml serumfreiem DME-Medium auf einer 24-Lochplatte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Luft. Die Faktoren Transforming Growth Factor (TGF)-β, Erythropoietin und Insulin, deren pro- bzw. antiapoptotische Wirkung auf die Retina untersucht werden sollte, wurden unmittelbar in den jeweils angegebenen Konzentrationen direkt zu dem Medium hinzugegeben.

Zusammensetzung des Mediums:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, F-12 Ham	15,6 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	1,2 g/l
Apo-Transferrin	0,1 g/l
Putrescin	6 mg/l
Progesteron	6 µg/l
Sodium Selenite	5,2 µg/l
Gentamicin	50 mg/l

Das Medium wurde in deionisiertem Wasser angesetzt und mit Natronlauge auf pH 7,15 eingestellt. Zuletzt erfolgte die Sterilfiltration, bevor das Medium bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert wurde.

Direkt vor dem Gebrauch wurde Glutamin zugesetzt (200mM Endkonzentration).

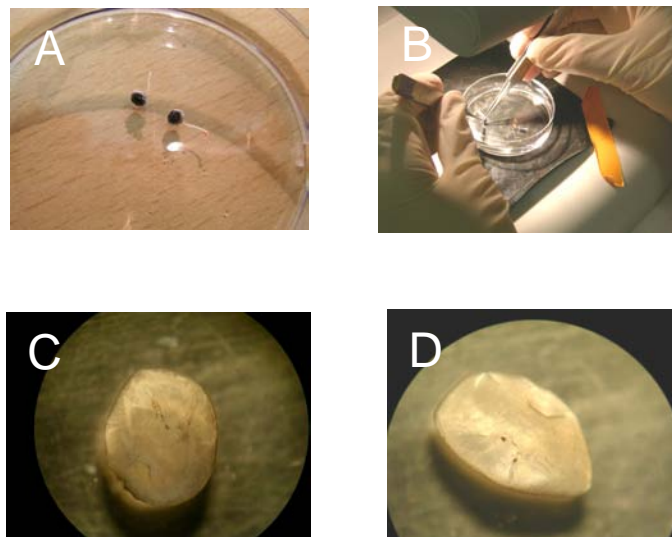


Abb.7:

**Präparation der Wholemount Retina einer P15-Maus.** (A) Augen einer 15-Tage alten Maus. (B) Präparationsvorgang. (C) Wholemount-Retina mit Blick auf die Ganglienzellschicht, 30 fach vergrößert. (D) Wholemount-Retina mit Blick auf die Photorezeptorzellschicht, 30 fach vergrößert.

### 2.2.2 Apoptosedetektion

Um im Anschluss an die Kultivierung die Apoptoserate der Retinae bestimmen zu können, wurden die Zellen enzymatisch und mechanisch dissoziiert und mit 2'4' Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI) gefärbt.

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Retinae nach 24 h Kultur zunächst in jeweils 900 µl Vorlegepuffer (1,8 mg/ml BSA in PBS) aufgenommen und dann bei 37°C, unter Zugabe von nacheinander 50 U/ml Kollagenase, 1,5 mg/ml Trypsin, 0,7 mg/ml Hyaluronidase und 0,1 mg/ml DNase im Abstand von jeweils fünf Minuten inkubiert. Gleichzeitig unterstützte die mehrfache Passage der Zellsuspension durch silikonisierte Glaspasteurpipetten die Vereinzelung der Retinazellen auf mechanischem Wege. Nach Herstellung einer homogenen Einzelzellsuspension wurden die enzymatischen Reaktionen mit EDTA abgestoppt und die Zellen 1 h lang in 8 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) auf einem Rollschüttler bei Raumtemperatur fixiert.

In Anschluss daran wurde die Zellsuspension bei 1500 Upm bei 4°C zentrifugiert, um danach den Überstand abzuschütten und die Zellen in jeweils 1 ml Waschpuffer (3 mg/ml BSA in PBS) zu resuspendieren. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Zellen in jeweils 500 µl Resuspensionspuffer (3 mg/ml BSA in PBS/ 5 mM EDTA/ 0,1 % Na-Azid) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Für die DAPI-Färbung wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension unter Verwendung des Cytospin mit 700 Upm für 7 min auf Objektträger aufgebracht und dann mit 2 µg/ml DAPI enthaltendem Dako Cytomation Fluoreszenz Einbettmedium gleichzeitig eingebettet und gefärbt.

Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurden mindestens 1000 Zellen pro Objektträger, unter denen sich mindestens 10 apoptotische Zellen befinden mussten, aus mindestens 10 Gesichtsfeldern, mit Hilfe eines NIKON ECLIPSE 1000 Mikroskop gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden dabei anhand morphologischer Kriterien identifiziert, nach denen sie sich durch ihre runde, gleichmäßige Form, die Homogenität ihres pyknotischen Zellkernes und ihr spezielles Färbeverhalten von vitalen Zellen unterschieden.

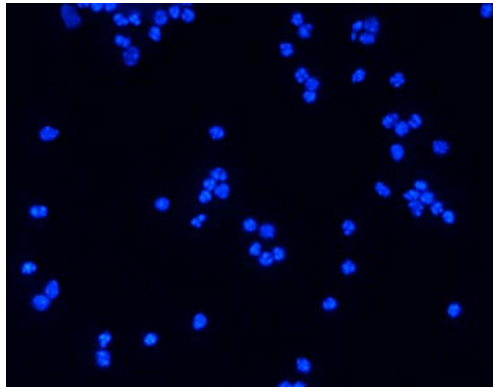


Abb.8:

**DAPI-Färbung von Cytospins retinaler Zellen von 2-Tage alten Mäusen. 400 fach vergrößert.**

### 2.2.3 Immuncytochemie an Cytospins

Da die alleinige DAPI-Färbung nicht die Unterscheidung der einzelnen Zelltypen der Retina gestattet, wurden Doppelmarkierung mit dem Ganglienzellmarker Brn3a bzw. dem Photorezeptorzellmarker Opsin und DAPI durchgeführt, um zu untersuchen, welche Zelltypen durch Epo vor Apoptose geschützt werden.

Im Rahmen der Immuncytochemie wurde das sogenannte Biotin-Streptavidin System verwendet, bei dem die Antikörper mit Biotin verknüpft sind und Biotin dann mit Streptavidin eine sehr stabile, nicht-kovalente Bindung eingeht. Gleichzeitig ist Streptavidin mit einem Farbstoff markiert und führt so zur Sichtbarmachung der Reaktion. Da aus diesem Verfahren eine Vervielfältigung des Signals resultiert, handelt es sich um eine sehr sensitive Detektionsmethode von Zielmolekülen. Eine weitere Verstärkung kann erreicht werden, indem nicht der Erstantikörper mit Biotin verknüpft wird, sondern noch ein biotinylierter Zweitantikörper zwischengeschaltet wird.

Für die Durchführung der Immuncytochemie wurden die Cytospins zuerst mit BGT1 (3 mg/ml BSA/ 100 mM Glycin/ 0,22 % Triton), zwecks Permeabilisierung der Zellen, vorinkubiert, da es sich bei den anzufärbenden Zielmolekülen um intrazelluläre Proteine handelt. Anschließend erfolgte eine Vorbehandlung mit dem Endogenous Biotin-Blocking Kit, wobei die Cytospins jeweils 10 min mit Avidin und danach mit Biotin Reagenz inkubiert und zwischen und nach den Inkubationen jeweils 3x10 min mit BGT1 gewaschen wurden.

Für die 30-minütige Blockierung der Cytospins wurde Normal Goat Serum (NGS) in BGT1 als Blockpuffer verwendet.



Nach dem Blockierungsschritt wurde der erste Antikörper über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert. Dazu wurden die Cytospins weiträumig mit einem DAKO Cytomation Pen umrundet, um ein Auslaufen oder Austrocknen der Antikörperlösung zu verhindern.

Am darauffolgenden Tag wurden die Cytospins 3x schnell und dann 3x10 min mit PBS gewaschen, bevor der biotinylierte Zweitantikörper in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben wurde.

Nachdem die Cytospins kurz mit PBS abgespült worden waren, sorgte die anschließende Inkubation mit FITC- oder CY3-konjugiertem Streptavidin für 1h im Dunkeln dann für die Sichtbarmachung des Signals.

Zuletzt wurden die Cytospins 6x schnell und 3x5 min mit PBS gewaschen, bevor sie mit 2 µg/ml DAPI enthaltendem Dako Cytomation Fluoreszenz Einbettmedium gleichzeitig eingebettet und gegengefärbt wurden.

	Blockierung	Konzentration des 1. AK	Art des 2. AK, Verdünnung	Streptavidin- Markierung, Verdünnung
<b>Brn3a</b>	10 % NGS in BGT1	1:100	goat biotinylated anti-mouse; 1:400	FITC 1:800
<b>Opsin</b>	15 % NGS in BGT1	1:10000	goat biotinylated anti-mouse; 1:400	CY3 1:800

Tab.1:

*Verwendete Blockierungslösungen, Antikörperkonzentrationen und Markierungsfarbstoffe der Immunzytochemie.*

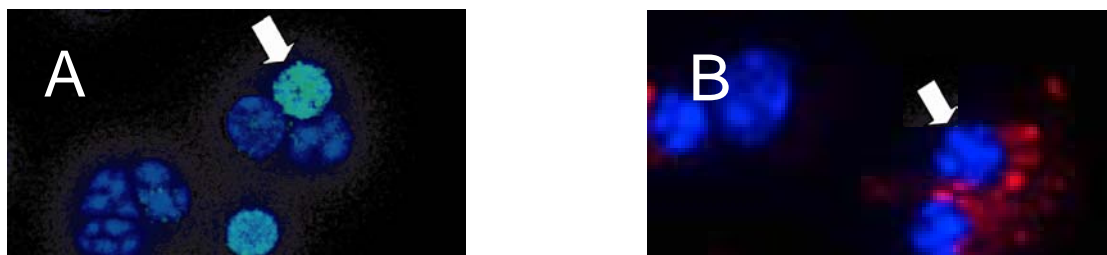


Abb.9:

*Immunzytochemie an Cytospins. (A) Brn3a- und (B) Rhodopsin- positive P15 retinale Zellen. Gegenfärbung mit DAPI. 600 fach vergrößert. Modifiziert aus Beier et al., 2006.*

#### 2.2.4 RNS-Präparation und cDNS-Synthese

Die Ribonukleinsäure (RNS) wurde mit Hilfe der sauren Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski (1987) isoliert. Dazu wurden die Gewebeproben, die nach der Kultur bzw. direkt nach der Organentnahme mit Flüssigstickstoff schockgefroren worden waren, mit 10 ml pro mg Gewebe, mindestens aber mit 700 µl, Guanidiniumthiocyanat (GTC) lysiert und vor RNAsen geschützt, um dann mit Hilfe von Pistel und Spritze im Falle der Retinae bzw. mit dem elektrischen Homogenisierstab homogenisiert und schließlich über Nacht bei -20°C eingefroren zu werden.

Am Folgetag wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut. 700 µl wurden pro Probe für die folgende RNS-Isolation entnommen, mit 70 µl NaOAc 2M pH 4 angesäuert und dann mit 560 µl Phenol und 280 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl versetzt. Nach Vortexen und Inkubation auf Eis für 1 h, wurden die Proben erneut durchmischt und 30 min bei 13000 Upm bei 4°C zentrifugiert, um eine Phasentrennung herbeizuführen, durch die sich die organischen Proteine in der unteren und die Nukleinsäuren in der oberen Phase anreicherten. Deshalb wurde die obere Phase in ein neues, 600 µl Isopropanol enthaltendes, Eppendorfreaktionsgefäß überführt, um die vom Protein gereinigte RNS somit zu fällen und wiederum über Nacht bei -20°C einzufrieren.

Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst für 30 min bei 13000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat 1 h an der Luft getrocknet, bevor es in 300 µl GTC und 400 µl Isopropanol resuspendiert und noch einmal über Nacht bei -20°C gelagert wurde.

Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 13000 Upm bei 4°C, wurde der Überstand verworfen. Die Pellets wurden dann mit je 500 µl 75 %igem Ethanol gewaschen und hinreichend getrocknet. Zuletzt wurde die RNS in 15-30 µl DEPC-haltigem Wasser aufgenommen und ihr Gehalt photometrisch (Absorption bei 260nm) bestimmt. Die Reinheit der RNS wurde mit Hilfe des Quotienten aus der Absorption bei 260nm (für RNS)/ 280nm (für Protein) überprüft und lag bei allen weiter verwendeten Proben zwischen 1,7 und 2,0. Bis zum Gebrauch der RNS wurde diese bei -20°C aufbewahrt.

Die Umschreibung der RNS in complementary DNS (cDNS) erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase, ein aus Viren gewonnenes Enzym, das RNS abhängig DNS synthetisiert.

Pro Probe wurde 1 µg RNS in cDNS umgeschrieben. Die entsprechende Menge RNS wurde demnach mit 2 µl Oligo-dT versetzt und das Gemisch mit DEPC-Wasser auf ein

Volumen von 12 µl aufgefüllt. Nach dem Vortexen erfolgte eine Erwärmung auf 68°C für 20 min, die zur Denaturierung der RNS führte und den Oligo-dTs ermöglichte, sich an das Poly-A-Ende der RNS anzulagern. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert, um dann mit je 5 µl 5xM-MLVR5-Puffer, 5 µl NTPs, 2,5 µl DEPC-Wasser und 0,5 µl Reverser Transkriptase versetzt zu werden, so dass das Gesamtvolumen 25 µl betrug.

Die cDNS-Synthese erfolgte dann durch Erhitzen der Proben auf 45°C für 90 min, dann 52°C für 30 min und schließlich 95°C für 15 min zur Inaktivierung des Enzyms.

Die Lagerung der cDNS erfolgte bei 4°C.

#### 2.2.5 PCR und real-time PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur Amplifikation von DNS. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, Unterschiede im cDNS-Gehalt bestimmter Gene in Proben nachzuweisen, die ihrerseits die Unterschiede im mRNS-Gehalt dieser Gene widerspiegeln.

Als Enzym wird eine hitzestabile DNS-abhängige DNS-Polymerase, die Taq-Polymerase, verwendet, die bei der Hitzedenaturierung der DNS nicht zu Schaden kommt. DNS-Polymerasen benötigen für den Einbau von NTP's eine freie OH'-Gruppe, die ihnen mittels sogenannter Primer zur Verfügung gestellt wird. Primer sind Oligonukleotide, die komplementär zur DNS ausgewählt werden, so dass sie den Abschnitt der DNS eingrenzen, der amplifiziert werden soll. Nach der Anlagerung der Primer (Annealing) bei ihrer speziellen Annealing-Temperatur, die abhängig von ihrer Sequenz und Länge ist, findet die Synthese von DNS-Doppel- aus DNS-Einzelsträngen statt (Extension). Da im darauffolgenden Zyklus die neu synthetisierten Stränge auch als Templates dienen, findet eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-DNS statt.

Für die qualitative PCR wurden 1 µl cDNS pro Reaktion verwendet und mit je 4 µl NTPs, 5 µl PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50mM), je 1 µl der beiden gewünschten Primer, 38 µl Wasser und 0,15 µl Taq-Polymerase versetzt.

Zunächst wurde die RNS 3 min lang bei 96°C denaturiert, bevor ein Zyklus mit gewünschter Anzahl durchlaufen wurde. Bei diesem Zyklus wurde die DNS noch einmal für 1min bei 96°C denaturiert, dann für 1,5 min auf die jeweilige Annealingtemperatur der Primer und anschließend für 1 min auf 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhitzt.

Alle verwendeten Primer wurden so ausgewählt, dass sie auch für die real-time PCR eingesetzt werden konnten und wiesen deshalb ausnahmslos eine Annealingtemperatur von 60°C auf.

Die amplifizierte DNS wurde dann mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel mit 0,2 % Ethidiumbromid bei einer Spannung von 80 V sichtbar gemacht. Da das Ethidiumbromid in die DNS interkaliert, kann diese mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden und die Fragmentlänge im Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker überprüft werden.

Für die Quantifizierung der DNS wurde der qPCR Mastermix for Sybr Green I-System verwendet. Dabei wird die DNS nach dem Prinzip der PCR amplifiziert, wobei aber gleichzeitig die Menge an amplifizierter DNS bestimmt wird. Dazu enthält der Mastermix, neben der Taq-Polymerase, dem PCR-Puffer und den NTP's, den Fluoreszenzfarbstoff CYBR Green, der nur in Gegenwart von Doppelstrang-DNS, nicht aber in Gegenwart von Einzelstrang-DNS, stark fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität wird in allen Proben gleichzeitig in kurzen Intervallen während der gesamten PCR gemessen und ermöglicht durch den Vergleich mit der Fluoreszenzintensität der Standards mit bekanntem cDNS-Gehalt für das jeweilige Zielgen die Berechnung der cDNS-Menge der Proben für das Zielgen.

Der Ansatz pro Probe bzw. Standard enthielt je 50 µl 2xPCR-Puffer, 44 µl Wasser und je 2 µl der jeweiligen Primer sowie 2 µl cDNS bzw. Standard. Eine 96-Lochplatte wurde zunächst mit dem Leerwert (2 µl Wasser statt cDNS) und den Standards zwischen 1000 und 0,001 fg/µl und anschließend mit den Proben beladen, wobei das Reaktionsvolumen von jeweils 25 µl eine Dreifachbestimmung ermöglichte.

Die real-time PCR im ICycler wurde als sogenannte two-step PCR durchgeführt, bei der nach einmalig 2 min 50°C und 10 min 95°C, 45 Zyklen mit 95°C für 15 s und 60°C für 1 min durchlaufen wurden. Lediglich bei der Quantifizierung von Aktin waren 40 Zyklen ausreichend.

Zielgen	Primer-Art	Sequenz
Aktin	mAktin 5'	ccc ctc tga acc cta agg cc
	mAktin 3'	gga caa cac agc ctg gat gg
Epo	mEpo D	ctg gga gct cag aag gaa ttg atg
	mEpo 3'	ccg gag gaa gtt ggc gta gac
EpoR	mEpoR 5'	tca ccc aac gct tgg aag ac
	mEpoR 3'	tga ctc acc ctc gag ctg gt
Bcl-2	mBcl-2 5'	tct ctc gtc gct acc gtc g
	mBcl-2 3'	ccg aac tca aag aag gcc ac
Bax	mBax 5'	gcg tcc acc aag aag ctg ag
	mBax 3'	tgc cat cag caa aca tgt ca

*Tab.2:*

***Für die qualitative und quantitative PCR verwendete Primer mit Sequenzen.***

#### 2.2.6 Hämatokrit- und Hämoglobinmessungen

Die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte der Mäuse wurden aus Mischblut der großen Gefäße, Aorta und Vena Cava, bestimmt.

Für die Hämatokritmessung wurde Blut in eine 50 µl Heparinkapillare überführt und diese dann zur Trennung von Blutzellen und Blutplasma 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Mittels einer Hämatokritrharfe wurde schließlich der Volumenanteil der Erythrozyten am Blutvolumen ermittelt.

Um den Hämoglobingehalt photometrisch bei 546 nm bestimmen zu können, wurde eine 20 µl Heparinkapillare mit Blut gefüllt und in 4 ml Drabkinsche Lösung (0,5 g Natriumbikarbonat, 100 mg Kaliumferricyanid, 25 mg Kaliumcyanid in 500 ml Aqua dest.) überführt, so dass alle Formen des Hämoglobins (Oxy-, Desoxy-, Meth- und CO-Hämoglobin) in Cyanmethhämoglobin umgewandelt wurden und Licht derselben Wellenlänge (546nm) absorbierten. Somit konnte die Hämoglobinkonzentration  $c$  nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:  $E = c \times d \times \epsilon$  berechnet werden. Die Schichtdicke  $d$  betrug 1 cm und  $\epsilon$  betrug 0,0027 l / (g x m).

### 2.2.7 Proteinisolierung

Für alle Western-Blot Analysen wurden durchweg Kernextrakte der Retinae mit Hilfe des NE-PER and Cytoplasmic Extraktion Reagents Kit (Pierce Biotechnology) isoliert, das sich aus drei Reagenzien namens Zytoplasma Extraktions Reagenz I (CERI), Zytoplasma Extraktions Reagenz II (CERII) und Kern Extraktions Reagenz (NER) zusammensetzt.

Zunächst wurden die Retinae, die nach der Kultivierung mit Flüssigstickstoff schockgefroren worden waren, auf Eis aufgetaut und mit 550 µl CERI und 27,5 µl 2x Proteaseinhibitor versetzt, so dass sie vor dem Verdau durch Proteasen geschützt waren. Die Homogenisierung mit Pistel und Spritze, analog zur RNS-Isolierung, förderte das durch CERI bewirkte Auflösen des Zellverbandes sowie das Aufbrechen der Zellmembranen und Freisetzen der zytoplasmatischen Bestandteile. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden je 30,3 µl CERII hinzugefügt und alle Proben für je 1 min gemischt, um die Freisetzung des Zytoplasmas weiter voranzutreiben.

Die anschließende Zentrifugation bei 10000 Upm für 5 min bei 4°C trennte dann die intakt gebliebenen Zellkerne von der Zytoplasmafraktion, die sich als Überstand darstellte und abgeschüttet wurde. Die in der verbleibenden Fraktion enthaltenen intakten Zellkerne wurden dann mittels Zugabe von 60 µl NER und 3 µl 2x Proteaseinhibitor sowie 40-minütigem Umrühren mit Magnetrührfischen auf Eis lysiert.

Letztendlich konnten dann die nukleären Proteine durch 2-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm von den restlichen Zellkernbestandteilen abgetrennt und bis zur Western-Blot-Analyse bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.8 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde mittels der Methode nach Lowry durchgeführt. Dabei bilden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, die im Folin-Ciocalteu-Reagenz enthalten sind, einen Farbkomplex mit den Stickstoffatomen der Peptidbindungen der Proteine. Somit kann eine Reduktion des zweiwertigen zu einwertigem Kupfer erfolgen. Dieses einwertige Kupfer wiederum reduziert zusammen mit einigen aromatischen Aminosäure-Resten wie Tyrosin und Tryptophan das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Der daraus resultierende Farbumschlag des Folin-Reagenzes nach tiefblau kann zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt werden.

Die hergestellten Standards (25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 und 0,1 mg/ml BSA) und die Proben wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und je 20 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Lochplatte pipettiert. Pro Vertiefung wurden 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B des

DC Proteinassay Reagenz von BioRad hinzugefügt, 10 Minuten inkubiert und schließlich mit Hilfe des ELISA-Readers bei 700 nm gemessen.

#### 2.2.9 Western Blot Analyse

Bei der Western-Blot Analyse werden die isolierten Proteine in einem Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Auf den Membranen können schließlich Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Dazu wurden je 7-12 µg Kernextrakt in Probenpuffer (0,4 ml A. dest, 1,6 ml 0,5 M Tris pH 6,8, 3,2 ml 10 % SDS, 0,8 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml 0,5% Bromphenolblau, 10% Glycerin) aufgenommen und nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C auf das Gel gebracht, wobei ausnahmslos 10 %ige Trenn- und 5 %ige Sammelgele verwendet wurden.

Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 90 min, an die sich der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembranen (Blotten) bei 110 V für ebenfalls 90 min anschloss. Danach wurden die Membranen zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteintransfers kurz in Ponceau-Lösung getaucht. Im Anschluss wurden die Membranen mit TBS-T (TBS (20mM Tris-Base, 140mM NaCl, pH 7,6) mit Tween20 (1:2000)) gewaschen und zur Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper in 5 %igem Magermilchpulver, gelöst in TBS-T, für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit primären monoklonalen Antikörpern erfolgte grundsätzlich bei 4°C über Nacht und war gefolgt von drei Waschschritten à 3 min mit TBS-T. Die anschließende Inkubationszeit der sekundären Antikörper betrug in der Regel eine Stunde. Die Reaktion wurde nach fünf dreiminütigen Waschschritten mittels Chemilumineszenz (ECL Advance Western Blotting Detection Kit) sichtbar gemacht, indem die Membranen 5 min in der Detektionslösung inkubiert und dann die Lichtsignale auf Röntgenfilmen festgehalten wurden.

	<b>Blockierung</b>	<b>Konzentration des 1. AK</b>	<b>Art des 2.AK, Verdünnung</b>	<b>Exposition in min</b>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	5 % Magermilch in TBS-T	1:500	rabbit; 1:1mio	2-5
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	5 % Magermilch in TBS-T	1:500	rabbit; 1:mio	20
<b>phospho STAT 5</b>	5 % Magermilch in TBS-T	1:1000	rabbit; 1:100000	10-20
<b>STAT 5</b>	5 % Magermilch in TBS-T	1:1000	rabbit; 1:1mio	2-5

*Tab.3:*

*Für die Western-Blot Analyse verwendete Blockierungslösungen, Antikörperkonzentrationen und Expositionszeiten.*

#### 2.2.10 Epo-ELISA

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist die Bezeichnung für ein antikörpervermitteltes Nachweisverfahren von Proteinen, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.

Der Nachweisversuch von Epo in muriner Retina erfolgte mittels des Mouse/Rat Epo Immunoassay der Firma R&D Systems.

Die 96-Lochplatte dieses ELISAs war bereits mit einem für Epo spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet und wurde dann zunächst mit je 50  $\mu$ l Assay Diluent pro Vertiefung beschickt, um unspezifischen Bindungen von Proteinen an den Plattenboden vorzubeugen.

Anschließend wurden je 50  $\mu$ l Standard (3000 – 47 pg/ml), Kontrolle oder Probe als Doppelbestimmung in die Vertiefungen pipettiert, nachdem die Retinae ganz zu Anfang des Versuches in PBS auf Eis mit Pistel und Spritze homogenisiert worden waren. Danach wurde die Platte abgedeckt und 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, so dass das in den Proben und Standards enthaltene Epo-Protein von den auf dem Plattenboden haftenden Epo-spezifischen Antikörpern gebunden werden konnte.

Um dann alle Zellbestandteile zu entfernen, die nicht während der Inkubationszeit von den Antikörpern gebunden worden waren, wurde die Platte fünf mal mit je 400  $\mu$ l Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen.



Daraufhin wurden pro Vertiefung 100  $\mu$ l des Epo-Konjugates pipettiert, das Epo-spezifische monoklonale Antikörper, an die das Enzym Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, sowie Blockierungslösung enthielt. Innerhalb einer weiteren zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln, konnten nun diese Enzym-gekoppelten Antikörper das Epo-Protein binden, das zuvor von den Antikörpern auf dem Plattenboden in der Platte zurückbehalten worden war.

Nach weiteren fünf Waschschritten wurden dann 100  $\mu$ l Substrat Lösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (TMB), in die Löcher hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. In dieser Zeit katalysierte die HRP unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid die Umwandlung von TMB in ein blaues Produkt. Nach Zugabe von je 100  $\mu$ l Stopplösung (HCL) wurde die Extinktion der Proben bei 450 nm und 540 nm mit Hilfe des ELISA-Readers gemessen und die Epokonzentration in den Proben anhand der Extinktion der Standards errechnet.

#### 2.2.11 Caspase Assay

Um die Caspase-Aktivität der Netzhautzellen zu messen, wurde der Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay von Promega verwendet, der sich zu Nutze macht, dass die Caspasen 3 und 7 Proteine spezifisch am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) spalten. Das in diesem Assay eingesetzte Substrat Z-DEVD-Rhodamin110 (-R110) fluoresziert erst nach Umwandlung zu R110 durch Abspaltung des DEVD-Fragments mittels Caspase 3 oder 7.

Für die Durchführung des Assays wurden die Retinae zunächst in PBS mit Pistel und Spritze auf Eis homogenisiert und der Proteingehalt der Proben bestimmt. Anschließend wurden 90  $\mu$ g Protein pro Zellsuspension in PBS mit einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l und ein Leerwert (Wasser statt Zellsuspension) auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Dann wurden 100  $\mu$ l des Apo-ONE Caspase-3/7 Reagenz, bestehend aus einem Lysepuffer zur Zellpermeabilisierung und dem Caspase Substrat Z-DEVD-R110, pro Probe hinzugefügt und gemischt.

Über eine Dauer von 5,5 h wurde dann die Fluoreszenz der Proben mit Hilfe des Microplate Fluoreszenz Readers Flx 800 regelmäßig im Abstand von 15 min, nach vorherigem Schütteln für 3s, bei einer Extinktion von  $485 \pm 20$  nm und einer Emission von  $530 \pm 25$  nm gemessen. Bei der Annahme, dass die entstehende Menge an fluoreszierendem Rhodamin110 proportional zur Caspase-3/7 Aktivität ist, lässt sich diese als Steigung des Graphen Fluoreszenz zur Zeit darstellen.

#### 2.2.12 Wholamount-Kultur in Hypoxie und Hyperoxie

Um die HIF-Regulation in der Retina zu untersuchen, wurden zunächst Zellkulturversuche unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Retinae wie oben beschrieben aus P15 Mäusen entnommen und in je 1ml DME-Medium auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte vom Typ Petri-Perm, mit einem gasdurchlässigen Boden, für 1 bzw. 2h kultiviert, so dass die Netzhäute leicht mit Medium bedeckt waren, damit der Sauerstoff diese durch Diffusion erreichen konnte. Die normoxischen Bedingungen waren als 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C, die hypoxischen Bedingungen als 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C definiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Retinae schnellstmöglich in Flüssigstickstoff eingefroren, um eine Degradation des HIF zu verhindern, das unter Normoxie eine Halbwertszeit von unter 5min aufweist.

Für die Kultivierung unter Hyperoxie wurde eine Plexiglaskammer verwendet, die Platz für die 6-Loch-Zellkulturplatte bot und die Zu- und Ableitung eines Gasgemisches über ein Schlauchsystem ermöglichte. Dabei setzte sich das wasserdampfgesättigte Gasgemisch aus 45 % N<sub>2</sub>, 50 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> zusammen, und die Kammer wurde während der 3stündigen Kultur bei 37°C aufbewahrt.

#### 2.2.13 Immunhistochemie an Cryostatschnitten von 17k- und 22k-Epo-GFP Mäusen

Um den Zelltyp zu identifizieren, der in der Retina für die Expression von Epo verantwortlich ist, wurden sogenannte 17k- und 22k-GFP Mäuse aus dem Labor Center for Tsukuba Advanced Research Alliance der Universität Tsukuba in Tsukuba, Ibaraki, Japan, verwendet. Diese Mäuse exprimieren das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) unter der Kontrolle der Epo-Gen regulierenden Region. Das heißt, dass bei der Expression des Epo-Gens gleichzeitig GFP von diesen Zellen exprimiert wird und anstelle von Epo nachgewiesen werden und als Zeichen für eine Epo-Expression der Zelle gewertet werden kann (Suzuki et al., 2007).

Zunächst wurden die Mäuse genotypisiert, um zwischen transgenen und Wildtypmäusen unterscheiden zu können. Dafür wurden ca. 1-2 mm des Mäuseschwanzes abgetrennt und in 300 µl 50mM NaOH-Lösung für 1-2 h bei 100°C inkubiert, um die DNS freizusetzen. Danach wurden 30 µl 1M Tris-Cl-Lösung (pH 8) hinzugefügt und das Transgen mittels qualitativer PCR und anschließender Gelelektrophorese, wie bereits oben beschrieben, nachgewiesen.

Zielgen	Primer-Art	Sequenz
GFP	GFPs4	ctg aag ttc atc tgc acc acc
	GFPas4	gga gtt gta act cca gct tgt gc

*Tab.4:****Für die Genotypisierung verwendete Primersequenzen.***

Nach der Genotypisierung konnte dann die Eukleation der Augen von Wildtyp- und transgenen Mäusen erfolgen, die in je 1 ml 4% igem PFA auf einer 24-Loch-Zellkulturplatte über Nacht bei 4°C auf einem Schwenkschüttler fixiert wurden. Am darauf folgenden Tag wurden die Augen zweimal mit je 1 ml PBS für 30 min bei 4°C gewaschen, um dann über Nacht in je 1 ml 20% iger Saccharose bei 4°C auf dem Schwenkschüttler inkubiert zu werden. Am zweiten Versuchstag konnten die Augen dann in Einbettmedium bei -80°C aufgefroren werden.

Von diesen aufgefrorenen Augen wurden 7 µm dicke Cryostatschnitte angefertigt und für eine ausreichende Haftung auf Superfrost-Objektträger aufgebracht, die bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

Für den Nachweis von GFP mittels Immunhistochemie wurden die Gefrierschnitte zunächst vor einem Ventilator ausreichend getrocknet, anschließend 3 mal für je 5 min mit PBS gewaschen und schließlich für 1 h in 3 % Wasserstoffperoxid in PBS bei 4°C inkubiert, um die natürliche Peroxidase-Aktivität der Proben zu reduzieren. Danach erfolgten erneut drei Waschschrte mit PBS à 5 min. Um ein Auslaufen der später applizierten Lösungen zu verhindern, wurden die Proben auf den Objektträgern mit einem DAKO Cytomation Pen umrundet. Die Blockierung wurde für 1 h mit 5 % NGS/ 1 % BSA in PBS-MT (20 % Magermilch in PBS mit 0,1 % Triton) (1:5) als Blockpuffer bei Raumtemperatur vorgenommen, bevor die Schnitte mit anti-GFP Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 in Blockpuffer bei 4°C über Nacht inkubiert wurden.

Der nächste Versuchstag begann mit drei Waschschrten à 5 min mit PBS auf Eis. Danach wurde der Merrettich-Peroxidase (HRP) -konjugierte anti-rabbit IgG Sekundärantikörper in 1:500 Verdünnung in PBS-T (PBS mit 0,1 % Triton) für 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen, gefolgt von weiteren drei 5-minütigen Waschschrten mit PBS.

Die Detektion wurde nach gleichen Prinzip durchgeführt, wie schon für den ELISA beschrieben, nur dass anstelle von TMB das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) verwendet wurde, das zu einer Braunfärbung führt. Zur Anfertigung der Färbelösung

wurden 0,0003 g/ml DAB in PBS-T frisch im Verhältnis 1:5000 mit der Substratlösung aus 0,05 % Wasserstoffperoxid in PBS-T vermischt. Der Färbeprozess wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und die für die Anfärbung der Zellen benötigte Zeit gemessen, um anschließend die Schnitte der Wildtypmäuse ebenso lange der Färbelösung auszusetzen. Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. Nachdem den Schnitten mit einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzogen worden war, wurden sie mit Xylol und DePeX Eindeckmedium eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit angeschlossener Fotokamera.

#### 2.2.14 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm GraphPad Prism 4 verwendet (GraphPad Software Inc.). Es wurden der one-way ANOVA (Analysis of Variance)-Test und der Newman-Keuls-Test bzw. der Student's-t-Test, bei zwei Gruppen, zum Vergleich der Gruppen untereinander angewendet. Die Grenze der Irrumswahrscheinlichkeit wurde mit 5 % festgelegt. Als statistisch signifikant galten alle darunter liegenden Werte:

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### **3 Ergebnisse**

Der Anfangsteil dieses Kapitels thematisiert das Expressionsmuster von Epo während der Retinaentwicklung sowie die Identifikation der Epo-exprimierenden Zellen. Im Anschluss daran wird die Regulation von HIF in der Retina betrachtet, bevor die Untersuchung der neuroprotektiven Funktion von Epo und der Interaktion mit Insulin und TGF- $\beta$  folgt. Die Aufklärung der Signalwege wird im letzten Teil des Kapitels dargestellt.

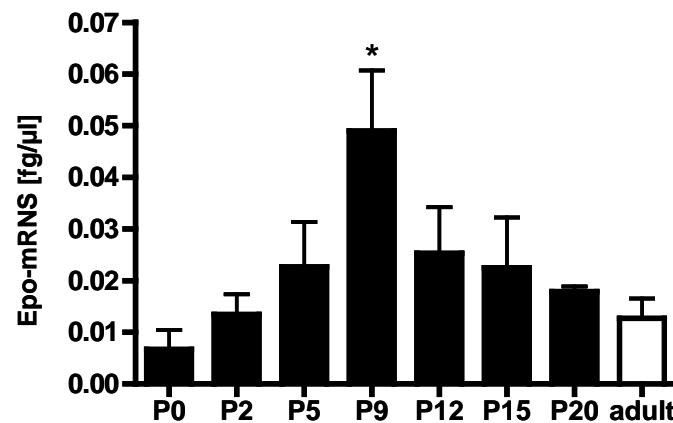
#### **3.1 Expression von Epo während der Retinaentwicklung der Maus**

Die Expression von Epo wurde zunächst auf der Ebene der mRNA untersucht und mit dem Zeitpunkt der Neugeborenenanämie sowie der Epo-mRNA Expression von Niere und Leber korreliert. Anschließend wurde ein Epo-ELISA zum Nachweis des Proteins in der Retina durchgeführt. Die Identifikation der Epo-exprimierenden Zellen erfolgte in 17k- und 22k-Epo-GFP Mäusen.

##### **3.1.1 Epo-mRNA Expression der murinen Retina**

Die durchgeführte RT-real-time-PCR nach Organentnahme und RNA-Isolation von Retinae neugeborener, 2-, 5-, 9-, 12-, 15-, 20- Tage alter sowie adulter Mäuse zeigte zunächst einen signifikanten Anstieg der Epo-mRNA Expression während der ersten neun Lebenstage mit dem Expressionsmaximum an P9 und ein anschließendes Absinken auf Werte neugeborener Mäuse (Abb.10).

Als mögliche Ursache für diese Epo-Expressionssteigerung in der Retina wurde eine Gewebhypoxie aufgrund einer transienten Anämie der Mäuse vermutet.

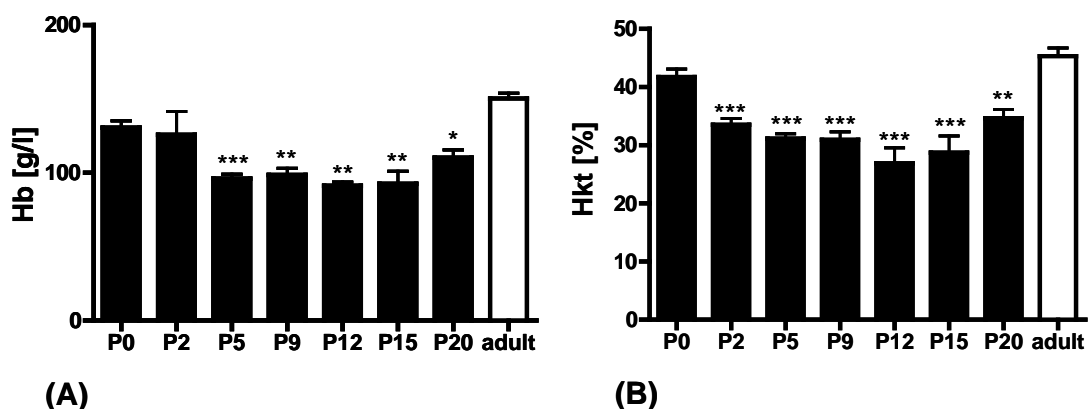


*Abb.10:*

*Epo-mRNS Expression muriner Retinae während postnataler Entwicklung (P0-20) und von adulten Tieren. RT-Real-time-PCR Daten nach Organentnahme und RNS-Isolation. Das Expressionsmaximum lag bei P9. (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$ )*

### 3.1.2 Korrelation der retinalen mit der renalen und hepatischen Epo-mRNS Expression sowie mit den Hämoglobin- und Hämatokritwerten

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Hämoglobin- und Hämatokritwerte der Mäuse in diesem Zeitraum untersucht und mit der retinalen Epo-Expression korreliert.



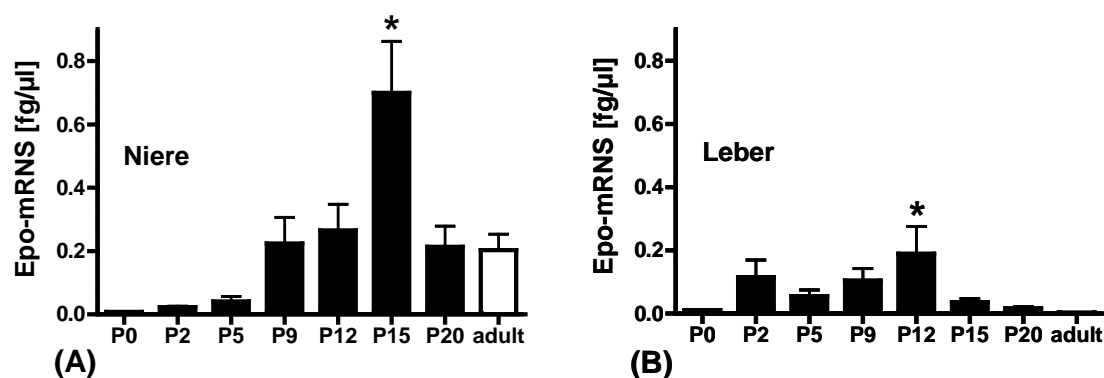
*Abb.11:*

*(A) Hämoglobin- und (B) Hämatokritwerte 0 bis 20 Tage alter sowie adulter Mäuse.*

*Während der ersten drei Wochen nach der Geburt spiegelte der Abfall der Hämoglobin- und Hämatokritwerte die Neugeborenenanämie der Mäuse wider. (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$ )*

Die Messergebnisse ergaben einen signifikanten Abfall der Hämoglobin- (Abb.11 A) und Hämatokritwerte (Abb.11 B) der Mäuse in den ersten 2 Wochen postnatal mit einem Minimum an P12 und spiegelten die sich in diesem Zeitraum manifestierende Neugeborenenanämie wider. Der Anstieg der Epo-mRNS Expression begann demnach gleichzeitig mit der Neugeborenenanämie, dauerte allerdings kürzer an als diese.

Als weitere Unterstützung für die Hypothese eines Kausalzusammenhangs zwischen Epo-mRNS Expressionssteigerung in der Retina und der Neugeborenenanämie wurden die Epo-mRNS Werte von Niere und Leber, den klassischerweise Epo-exprimierenden Organen, als Vergleich herangezogen.



*Abb.12:*

***Epo-mRNS Expression von (A) Niere und (B) Leber während postnataler Entwicklung (P0-20) und von adulten Mäusen.***

*Nieren- und Leberproben wurden aus den Mäusen entnommen, die RNS isoliert und anschließend RT-real-time-PCR durchgeführt. Expressionsmaxima zeichneten sich an P15 in der Niere (A) und an P12 in der Leber (B) ab. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3)*

In Niere und Leber ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Epo-mRNS Expression feststellen. Die Expressionsmaxima wurden allerdings erst an P15 in der Niere (Abb.12 A) und an P12 in der Leber (Abb.12 B) erreicht und traten somit einige Tage später als in der Retina auf. Das Epo-Expressionsmuster der Retina war vergleichbar mit dem in Niere und Leber, von denen bekannt ist, dass sie Epo sauerstoffabhängig exprimieren. Daher ist es höchst wahrscheinlich, dass die Neugeborenenanämie, aus der eine Gewebhypoxie resultiert, auch hier für die Expressionssteigerung von Epo in retinalen Zellen verantwortlich ist.

Gleichzeitig zeigten die Daten zur Epo-mRNS Expression von Niere und Leber deutlich, dass die Leber sich nur noch in den ersten zwei Wochen nach der Geburt bedeutsam an der

Epo-mRNS Expression beteiligte, dann aber die Niere ab P9 zunehmend Epo-mRNS exprimierte und in der dritten Lebenswoche der Wechsel des Epo-Expressionsortes von Leber zu Niere vollzogen zu sein schien.

### 3.1.3 Nachweis von Epo-Protein in der Retina

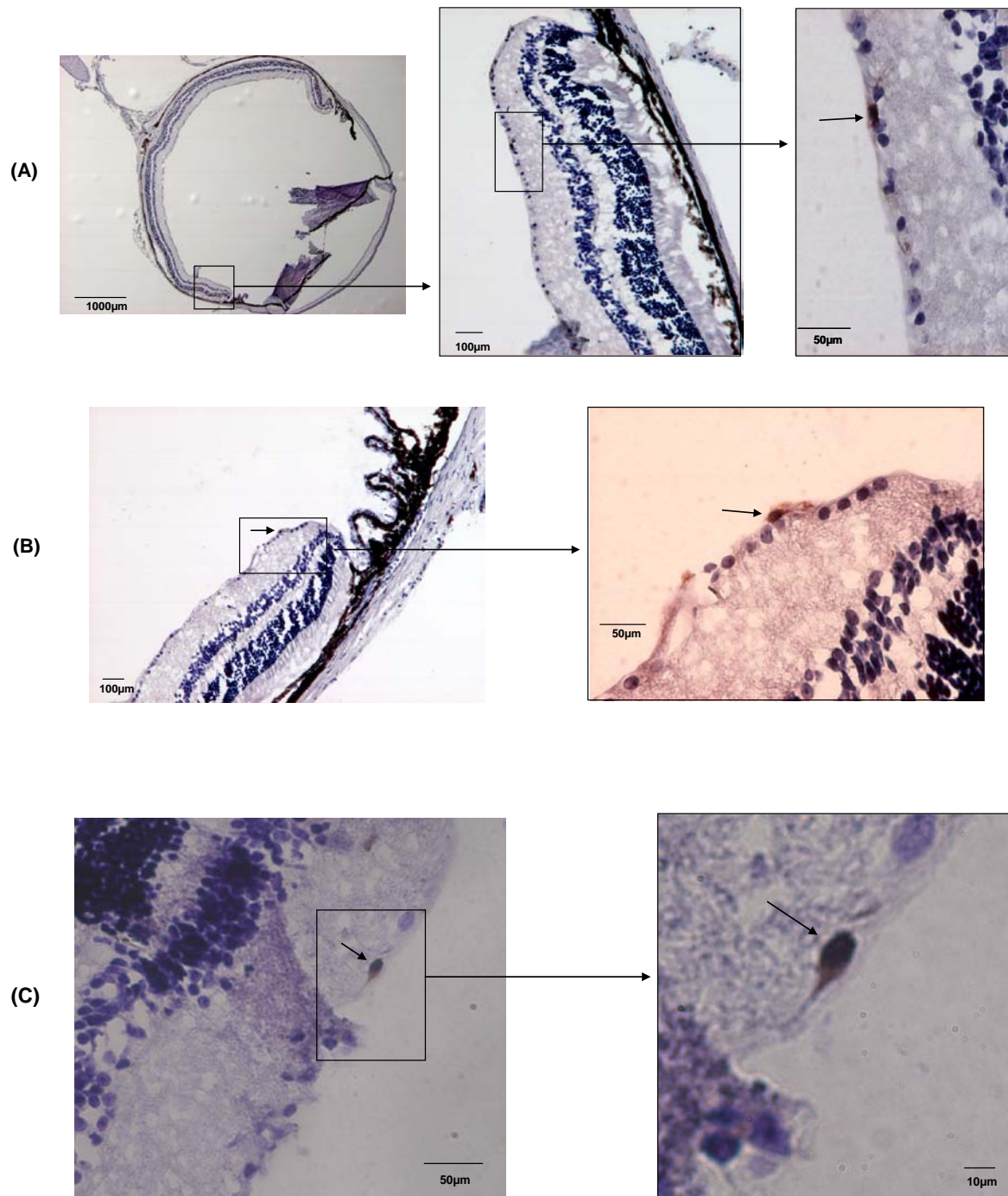
Der Nachweis von Epo-Protein in der Retina mittels eines Epo-ELISA von R&D Systems konnte nicht erbracht werden, da die Mengen an Epo-Protein unterhalb der Nachweisgrenze von 47 pg/ml lagen.

### 3.1.4 Identifikation der Epo-exprimierenden Zellen

Um die in der Retina Epo exprimierenden Zellen zu identifizieren, wurden sogenannte 17k- und 22k-Epo-GFP Mäuse verwendet. Diese Mäuse exprimieren GFP unter der Kontrolle der Epo-Gen regulierenden Region und exprimieren somit gleichzeitig zusammen mit Epo GFP, das deshalb anstelle von Epo nachgewiesen werden und als Zeichen für eine Epo-Expression der Zelle gewertet werden kann (Suzuki et al., 2007).

GFP wurde zunächst mittels Immunhistochemie an Cryostatschnitten der Augen von diesen 17k-Epo-GFP Mäusen nachgewiesen.





**Abb.13:**

***Epo-exprimierende Zellen in 17k- und 22k-Epo-GFP Mäusen.***

*An den Cryostatschnitte der Augen von (A) adulten 17k- und (B und C) 22k-Epo-GFP Mäusen wurden mittels Immunhistochemie mit einem anti-GFP-Antikörper und DAB-Färbung die GFP-exprimierenden Zellen angefärbt. Die DAB-positiven Zellen befinden sich in der Ganglienzellschicht der Retina.*

Die DAB-positiv gefärbten Zellen, die GFP und somit auch Epo exprimierten, ließen sich, wie in Abb.13 zu erkennen, in der Ganglienzellschicht der adulten 17k- (A) und 22k-Epo-GFP Mäuse (B und C) lokalisieren. Dabei fiel auf, dass sie sich hauptsächlich am Übergang der Pars optica in die Pars caeca der Retina befanden.

Anschließend wurde die Lokalisation der Epo-exprimierenden Zellen in der Retina während der frühen postnatalen Entwicklung untersucht. Dazu wurden Cryostatschnitte der Augen von 22k-GFP Mäusen der Entwicklungsstadien P0, 2, 5, 9, 12, 15 und 20 angefertigt und die GFP-exprimierenden Zellen mittels Immunhistochemie und DAB-Färbung nachgewiesen (Abb.14).

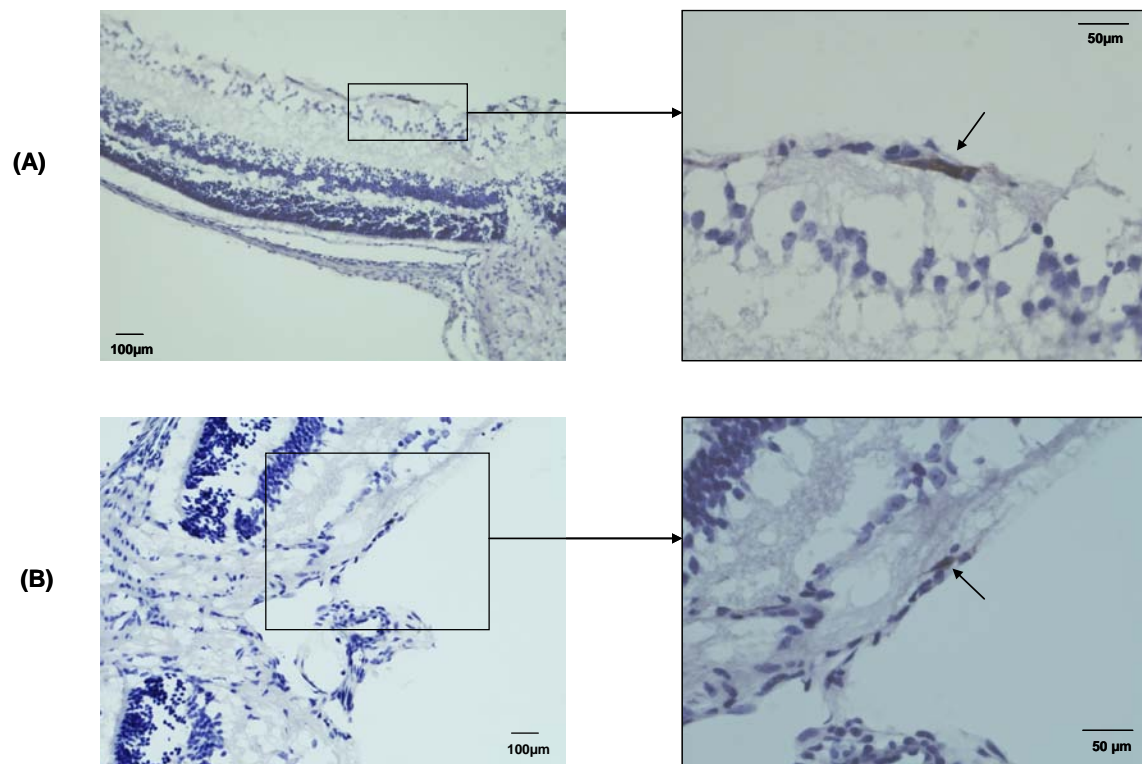


Abb.14:

***Epo-exprimierende Zellen in der Ganglienzellschicht von 9 (A) und 12 Tage alten (B) 22k-Epo-GFP Mäusen.*** Cryostatschnitte der Augen wurden nach Immunhistochemie mit einem anti-GFP Antikörper DAB-gefärbt. Die DAB-positiven Zellen befanden sich in der Ganglienzellschicht der Retina.

Die Auswertung der Cryostatschnitte unter dem Lichtmikroskop ergab keinerlei DAB-positive Zellen an P0, 2, 5, 15 und 20. An P9 waren dagegen aber im Vergleich zu den Proben von adulten Mäusen deutlich mehr gefärbte Zellen zu erkennen. Diese befanden sich auch in der Ganglienzellschicht, waren aber nicht auf die Nähe zur Ora serrata beschränkt lokalisiert, sondern waren ubiquitär und vor allem in der Nähe des Nervus opticus zu finden. Die Cryostatschnitte von 12 Tage alten 22k-Epo-GFP Mäusen ähnelten denen der 9 Tage alten Mäuse, enthielten aber nicht ganz so viele GFP positive Zellen (Abb.14).

### 3.2 HIF-Expression und –Regulation in der murinen Retina

HIF ist allgemein als der wichtigste Transkriptionsfaktor für die Regulation von Epo bekannt. Es sollte zunächst die HIF-1 $\alpha$ -Isoform in der Retina nachgewiesen werden. Da HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen aufgrund der schnellen Degradation in der Regel nicht detektierbar ist, wurden P15 Retinae für 1 bzw. 2 h sowohl unter Normoxie (21 % Sauerstoff) als auch unter Hypoxie (1 % Sauerstoff) kultiviert. Darüber hinaus sollte versucht werden, HIF-1 $\alpha$  auch in nicht kultivierten Retinae, direkt im Anschluss an die Retinapräparation zu bestimmen, um einen Hinweis auf die Sauerstoffversorgung der Retina zu erhalten.

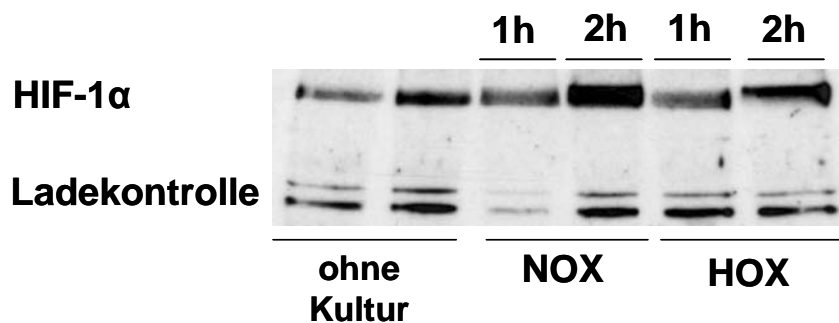


Abb.15:

#### ***HIF-1 $\alpha$ -Nachweis mittels Western-Blot-Analyse in P15 Wholemount-Retinae.***

*Die Retinae wurden direkt nach der Präparation oder nach der Kultivierung auf Petri-Perm Zellkulturschalen unter Normoxie (NOX) entsprechend 21 % O<sub>2</sub> oder unter Hypoxie (HOX) entsprechend 1 % O<sub>2</sub> schockgefroren und der Kernextraktion zugeführt. Für die Western-Blot Analyse wurden je 8,5  $\mu$ g Protein aufgetragen. ~~auf~~ <sup>an</sup> die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  in den nicht-kultivierten und in den unter normoxischen Bedingungen kultivierten Proben.*

Überraschenderweise zeigten nicht nur die hypoxischen Retinae, wie zu erwarten gewesen wäre, eine Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ , sondern auch die nicht-kultivierten und die unter normoxischen Bedingungen kultivierten Retinae (Abb.15). Daraus wurde geschlussfolgert, dass auch diese Proben einer hypoxischen Stoffwechsellaage ausgesetzt waren. Da alle Proben auf sogenannten Petri-Perm Zellkulturschalen kultiviert worden waren, wurde die Hypoxie der unter 21% Sauerstoff kultivierten Proben auf den hohen Sauerstoffverbrauch der Retinae und die hohe Anzahl an Zellschichten des Gewebes zurückgeführt.

Um dennoch die Regulation von HIF durch den Sauerstoffpartialdruck in der Retina zeigen zu können, wurden die Retinae in den folgenden Versuchen nicht mehr unter Hypoxie, sondern unter Hyperoxie, unter 50% Sauerstoff, kultiviert. Neben dem Nachweis von HIF-1 $\alpha$  sollte auch der von HIF-2 $\alpha$  erfolgen.

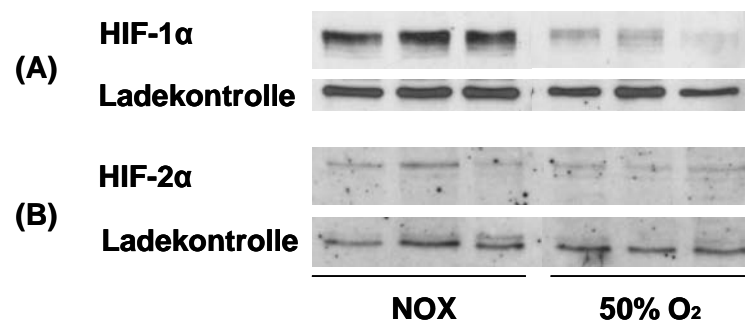


Abb.16:

**Verminderte Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  (A) und HIF-2 $\alpha$  (B) in P15 Retinae durch Kultivierung unter Hyperoxie.** Die Retinae wurden für 3 h unter 21 % (NOX) oder 50 % Sauerstoff auf Petri-Perm Zellkulturschalen kultiviert. Es wurden je 8  $\mu$ g Kernextrakt aufgetragen. HIF-1 $\alpha$  akkumulierte stark bei 21 % Sauerstoff und wurde unter Hyperoxie deutlich degradiert. Bei HIF-2 $\alpha$  fielen diese Vorgänge geringer aus.

Während HIF-1 $\alpha$  in den unter 21 % Sauerstoff kultivierten Retinae stark akkumulierte und durch die Begasung mit einem hyperoxischen Gasgemisch deutlich vermindert wurde (Abb.16 A), war der HIF-2 $\alpha$ -Gehalt in den Retinae insgesamt geringer (Abb.16 B).

### 3.3 Funktion von Epo während der postnatalen Retinaentwicklung der Maus

Zunächst erfolgte der Nachweis einer EpoR-mRNS Expression in der Retina als Grundvoraussetzung für eine Funktion von Epo in retinalen Zellen. Anschließend wurden Primärkulturen als Wholemount-Retinae während aller drei postnatalen Zelltodphasen mit rekombinantem Epo behandelt und auf eine Apoptoseinhibition durch Epo untersucht. Mittels immunzytochemischer Färbungen wurden daraufhin die Zielzellen identifiziert. Zuletzt erfolgte die Analyse der Interaktion von Epo mit TGF- $\beta$  und Insulin durch Kombinationsapplikationen dieser Faktoren in der Wholemount-Kultur.

#### 3.3.1 Nachweis von EpoR-mRNS

Da die Expression von EpoR die Voraussetzung dafür ist, dass Epo eine Funktion während der postnatalen Retinaentwicklung vermitteln kann, wurde zunächst der Nachweis von EpoR-mRNS mittels RT-real-time-PCR in der sich entwickelnden Retina angestrebt.

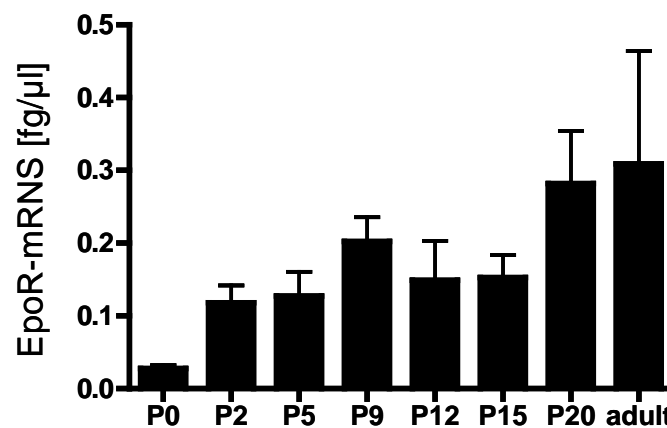


Abb.17:

***EpoR-mRNS Expressionsmuster der Retina von 0 bis 20 Tage alten sowie adulten Mäuse.*** Real-time-PCR Daten nach Organentnahme, RNS-Isolation und Umschreibung in cDNS zeigten eine kontinuierliche EpoR-mRNS Expression während der postnatalen Retinaentwicklung. (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$ )

EpoR-mRNS konnte in allen retinalen Entwicklungsstufen während der ersten drei Wochen nach der Geburt sowie in adulten Retinae detektiert werden (Abb.17) und erschloss somit die Möglichkeit einer Funktion von Epo während der Retinaentwicklung.

### 3.3.2 Neuroprotektive Funktion von Epo während der postnatalen Zelltodphasen

Um eine neuroprotektive Funktion von Epo für die Retinaentwicklung festzustellen, wurden retinale Wholemout-Kulturen für 24 h mit rekombinantem Epo (rEpo) während aller drei postnatalen Zelltodphasen, an P2 (Abb.18 A), 9 (B) und 15 (C), während denen die höchsten physiologischen Apoptoseraten zu verzeichnen sind, behandelt und auf eine Verringerung der Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen untersucht.

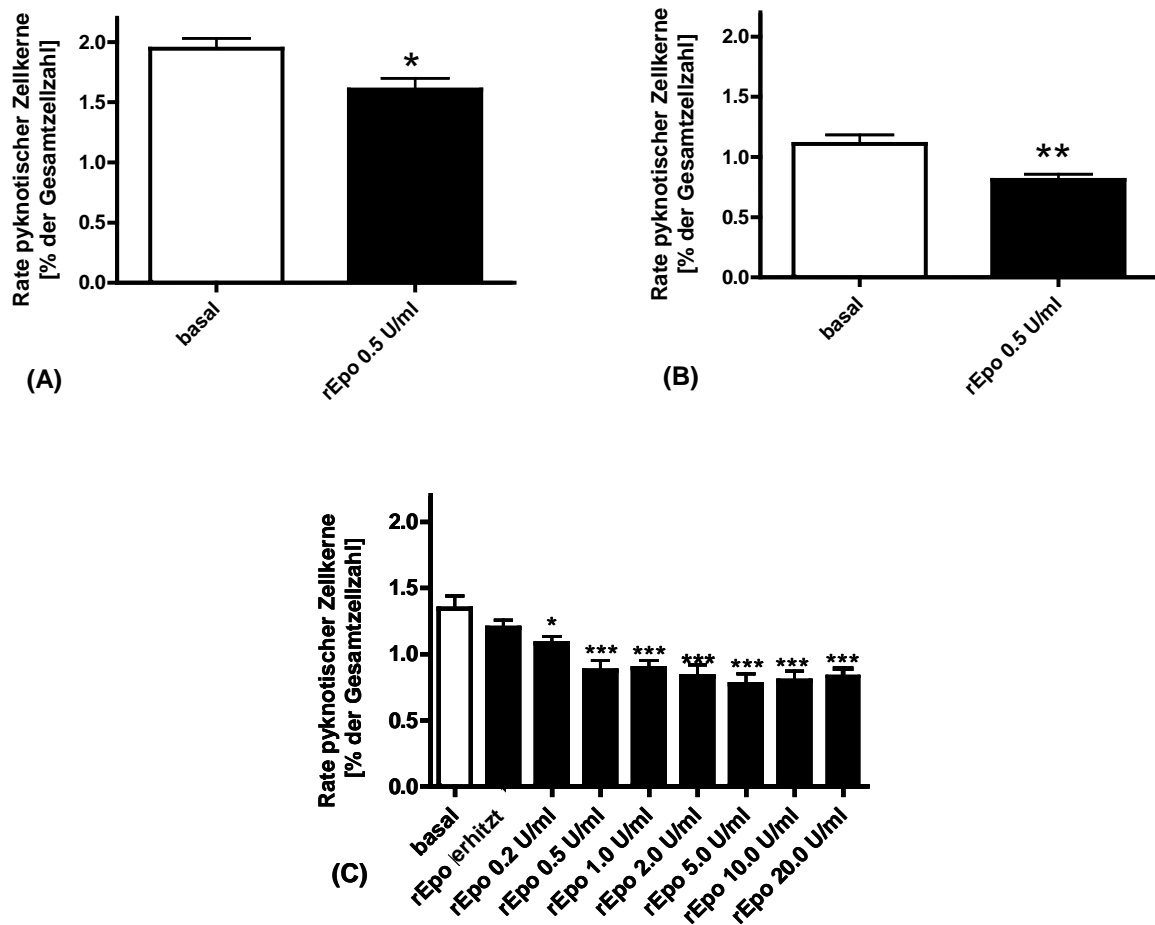


Abb.18:

**Neuroprotektive Funktion von Epo während aller drei postnatalen Zelltodphasen der murinen Retinaentwicklung:** (A) P2, (B) P9 und (C) P15. Die Wholemout-Retinae der Entwicklungsstadien (A) P2, (B) P9 und (C) P15 wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen an rEpo oder PBS (basal) behandelt, anschließend dissoziiert und fixiert. Die Apoptoseraten wurden durch Auszählen von DAPI-gefärbten pyknotischen Zellkernen ermittelt. Die Applikation von erhitztem Epo (C) diente als weitere Kontrolle. (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$ )

Zunächst erstellten wir eine Dosiswirkungskurve an P15 (Abb.18 C), um die am besten geeignete Konzentration von rEpo zur Erzielung eines neuroprotektiven Effektes zu ermitteln. Diese Konzentration, die so gering wie möglich sein, dabei aber eine deutliche Reduktion der Apoptoserate hervorrufen sollte, wurde bei 0,5 U/ml festgelegt und für die Experimente an P2 (Abb.18 A) und P9 (Abb.18 B) verwendet.

Zusammenfassend ergaben die Experimente, dass die Applikation von 0,5 U/ml rEpo während aller drei postnatalen Zelltodphasen zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate retinaler Zellen führte. Als zusätzliche Kontrolle wurde rEpo erhitzt, um sicher zu gehen, dass die Lösung mit hitzeinaktiviertem Epo für spezifische Effekte keine signifikante Wirkung mehr vermitteln konnte (Abb.18 C).

Somit konnte erstmals eine neuroprotektive Funktion von Epo während der Retinaentwicklung, als Modell von physiologisch stattfindender Apoptose, nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Identifikation der Zielzellen von Epo

Da an P15 sowohl Ganglien- als auch Photorezeptorzellen von Apoptose betroffen sind, sollten Doppelmarkierungen mittels Immunzytochemie klären, welcher dieser Zelltypen in den vorangegangenen Experimenten durch Epo vor Apoptose geschützt werden konnte. Dazu wurden Cytopins von mit rEpo behandelten Wholemount-Retinae mit Brn3a als Ganglien- bzw. Opsin als Photorezeptorzellmarker und DAPI gefärbt.

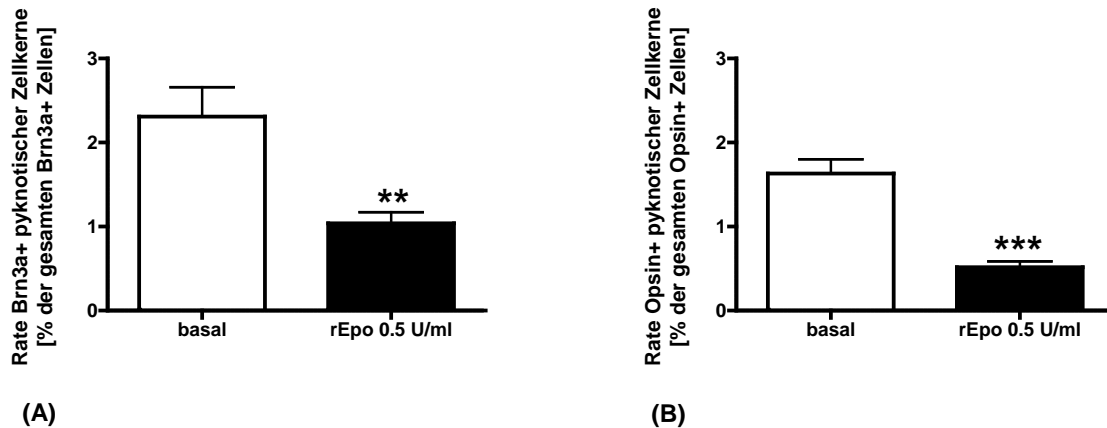


Abb.19:

**Neuroprotektiver Effekt von rEpo auf (A) retinale Ganglien- und (B) Photorezeptorzellen an P15.** Retinale Wholemounds wurden für 24 h mit rEpo oder PBS (basal) behandelt, anschließend dissoziiert und fixiert. Die Cytospins dieser fixierten Einzelzellsuspension wurden mittels Immunzytochemie mit dem Ganglienzellmarker Brn3a bzw. dem Photorezeptorzellmarker Opsin und DAPI gefärbt. Der Effekt von Epo auf diese Zelltypen wurde durch Auszählen der apoptotischen Brn3a- (A) bzw. Opsin- (B) positiv gefärbten Zellkerne ermittelt. (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$ )

Die Auswertung der doppelmarkierten Cytospins ergab, dass die Applikation von rEpo auf retinale Wholemound-Kulturen sowohl zu einer signifikanten Reduktion apoptotischer Ganglien- (Abb.19 A) als auch Photorezeptorzellen (Abb.19 B) führte.

Demnach ist die neuroprotektive Funktion von Epo nicht auf einen einzigen Zelltyp limitiert, sondern betrifft Photorezeptor- ebenso wie Ganglienzellen. Diese Befunde unterstützen die Hypothese einer umfassenden Wirkung von Epo, die zu einer adäquaten Retinaentwicklung beiträgt.

### 3.3.4 Interaktion von Epo mit TGF- $\beta$ und Insulin

Als für die Retinaentwicklung bedeutsame Faktoren sind das proapoptotische TGF- $\beta$  und das antiapoptotische Insulin bekannt. In weiteren Zellkulturexperimenten während der Zelltodphase an P15 wurde die Interaktion von Epo mit diesen Faktoren untersucht, indem rEpo und jeweils rekombinantes TGF- $\beta$  (rTGF- $\beta$ ) oder rekombinantes Insulin (rInsulin) gleichzeitig appliziert wurden und der Vergleich dieser Doppel- mit der Einzelbehandlung erfolgte. Zuvor wurde noch die optimale Konzentration von 2 ng/ml TGF- $\beta$  zur Auslösung von Apoptose mittels einer Dosiswirkungskurve an P15 Retinae ermittelt (Abb.20 A).



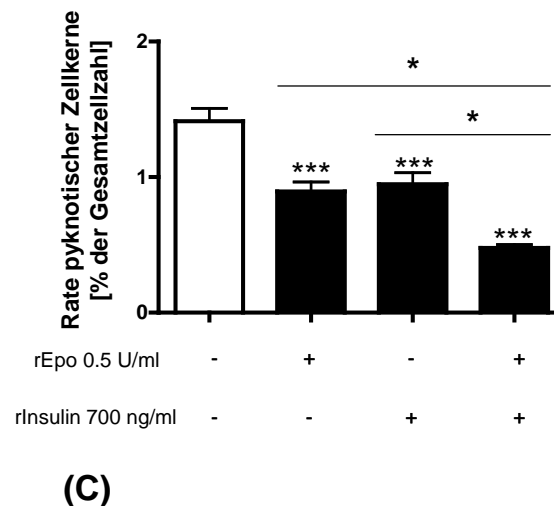
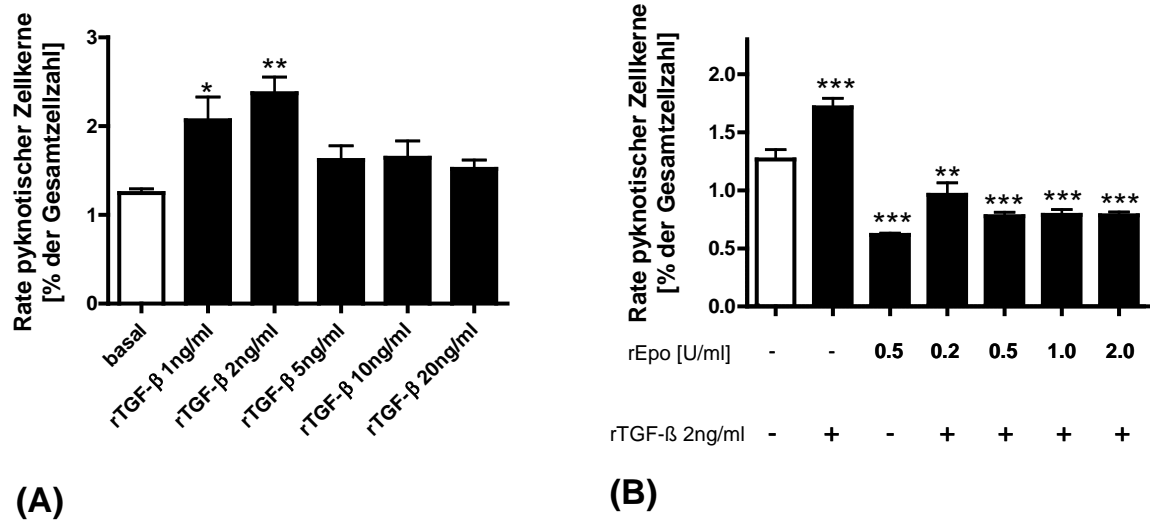


Abb.20:

**Dosiswirkungskurve von TGF-β an P15 Wholemount-Retinae (A) und Apoptoseraten in P15 Wholemount-Retinae bei Doppelbehandlung mit rEpo und rTGF-β (B) bzw. rInsulin (C) im Vergleich zur Einzelbehandlung.** Die Wholemount-Retinae wurden an P15 für 24h mit (A) rTGF-β in verschiedenen Konzentrationen, (B) rEpo in verschiedenen Konzentrationen und 2 ng/ml rTGF-β bzw. mit (C) 0,5 U/ml rEpo und 700 ng/ml rInsulin einzeln oder in Kombination behandelt. Anschließend wurden die Retinae dissoziiert und fixiert. Die Apoptoseraten wurden durch Auszählen der pyknotischen Zellkerne in der DAPI-Färbung ermittelt. (Mittelwerte ± SEM; n=3)

Die Behandlungen der Wholemound-Retinae mit rEpo und rTGF- $\beta$  zeigten, dass Epo nicht nur die TGF- $\beta$  induzierte Apoptose vollständig blockierte, sondern darüber hinaus weitere Zellen vor Apoptose schützen konnte, da die Apoptoseraten der Doppelbehandlungen signifikant niedriger ausfielen, als die der Kontrollen (Abb.20 B).

Durch die gemeinsame Applikation von rEpo und rInsulin auf P15 Wholemound-Retinae gelang es noch signifikant geringere Apoptoseraten zu erzielen als die Einzelfaktorbehandlungen ergaben (Abb.20 C).

### **3.4 Mechanismen der neuroprotektiven Funktion von Epo**

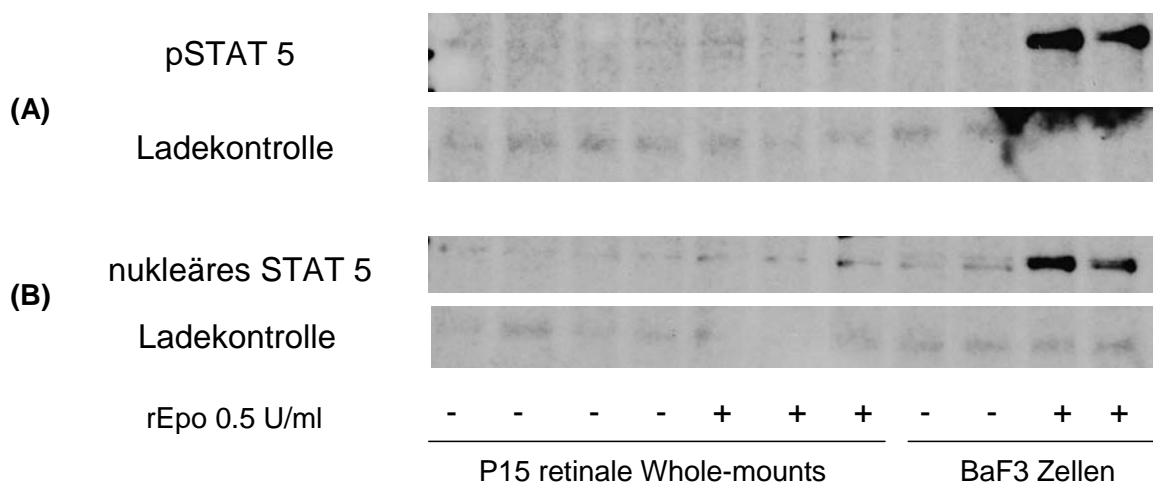
Die Signalwege, über die Epo seine neuroprotektive Wirkung während der postnatalen Retinaentwicklung vermittelt, wurden exemplarisch anhand von P15 Wholemound-Retinae aufgeklärt, da Epo in den vorangegangenen Zellkulturexperimenten (Abb.19) während dieser Zelltodphase den stärksten antiapoptotischen Effekt erzielen konnte.

Zunächst einmal wurde eine verstärkte Phosphorylierung von STAT5 als Zeichen einer Aktivierung des EpoR nachgewiesen. In Anschluss daran wurden mit Bax und Bcl2 sowie Caspase 3 Faktoren weiter unten in der möglichen Signalkaskade auf ihre Beeinflussung durch Epo untersucht.

#### **3.4.1 Nachweis verstärkter STAT-5 Phosphorylierung durch Epo in P15 Retinae**

Als Zeichen für eine Aktivierung des klassischen EpoR Heterodimers gilt unter anderem eine Phosphorylierung von STAT 5.

Aus für 15 min mit rEpo behandelten und Kontroll- P15 Wholemound-Retinae wurden Kernextrakte isoliert, in denen dann mittels Western-Blot Analysen die Detektion von phospho STAT 5 (pSTAT5) und STAT5 erfolgte (Abb.21).



**Abb.21:**

**Detektion von pSTAT5 (A) und STAT5 (B) in rEpo behandelten und unbehandelten P15 Retinae mittels Western-Blot Analyse.** P15 Retinae wurden für 15 min als Wholemounts unter Zugabe von rEpo oder PBS (basal) kultiviert und anschließend der Kernextraktion zugeführt. Für die Western-Blot Analyse wurden jeweils 12 µg (A) bzw. 7 µg (B) Protein geladen. Als negativ bzw. positiv Kontrollen dienten Kernextrakte von rEpo- bzw. unbehandelten BaF3 Zellen. In den rEpo behandelten Retinae wurden mehr pSTAT5 und nukleäres STAT5 nachgewiesen als in den unbehandelten Retinae.

Die rEpo behandelten Retinae zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Proben einen deutlich gesteigerten Gehalt an pSTAT5 (Abb.21 A). Auch ließ sich mehr nukleäres STAT5 in diesen Retinae nachweisen (Abb.21 B), als Hinweis auf eine gesteigerte Translokation von STAT5 in den Zellkern. In den rEpo behandelten BaF3 Zellen war ebenfalls sowohl mehr pSTAT5 als auch mehr STAT5 im Zellkern nachweisbar als in den unbehandelten Zellen. Die Retinae zeigten somit dieselbe Reaktion wie die BaF3 Zellen, die rEpo-abhängig wachsen und somit ein Modell für die Aktivierung des EpoR darstellen und hier als negativ und positiv Kontrollen dienten.

### 3.4.2 Einfluss von Epo auf die mRNS-Expression von Bcl-2 und Bax

Mit Bcl-2 und Bax wurden zwei Mitglieder der Bcl-2 Familie auf ihre Beeinflussbarkeit durch rEpo untersucht, die erwiesenermaßen während der Retinaentwicklung von pro- und antiapoptotischen Faktoren in ihrer Expression reguliert werden und somit an der Modulation der Zelltodphasen beteiligt sind.

Nachdem P15 Wholemount-Retinae für 24 h unter Applikation von rEpo oder PBS kultiviert worden waren, wurde die RNS isoliert und die Bcl-2- und Bax-mRNS Expression mittels RT-real-time-PCR quantifiziert (Abb.22).

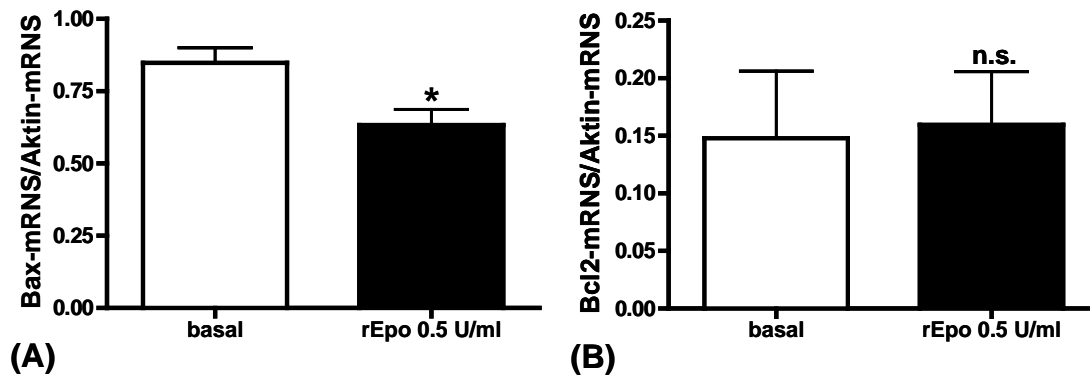


Abb.22:

***Einfluss von rEpo auf die mRNA-Expression von (A) Bax und (B) Bcl-2 in P15 Retinae.***

*P15 Wholemount-Retinae wurden nach der Kultivierung für 24h unter Zugabe von 0,5U/ml rEpo oder PBS (basal) für die RNS-Isolation verwendet. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von Bax und Bcl-2 erfolgte mittels RT-real-time-PCR und wurde auf die mRNA-Expression von Aktin in den Retinae bezogen. rEpo verminderte die Bax-mRNS Expression, hatte aber keinerlei Einfluss auf die mRNA Expression von Bcl-2. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3)*

Die Ergebnisse der real-time PCR zeigten, dass rEpo signifikant die mRNA Expression des proapoptotischen Bax im Vergleich zu Kontrollen reduzierte (Abb.22 A), allerdings keinerlei Veränderung der mRNA Expression des antiapoptotischen Bcl-2 hervorrief (Abb.22 B).

### 3.4.3 Auswirkungen von Epo auf die Caspase-3 Aktivität

Die Caspasen 3 und 7 stellen sich in ihrer Funktion als Effektorcaspasen als zentrales Element der Vermittlung von Apoptose dar. Deshalb sollte mittels eines Caspase-3/7-Assays überprüft werden, ob Epo Einfluss auf die Aktivität dieser Caspasen in P15 Wholemount-Retinae nehmen kann (Abb.23).

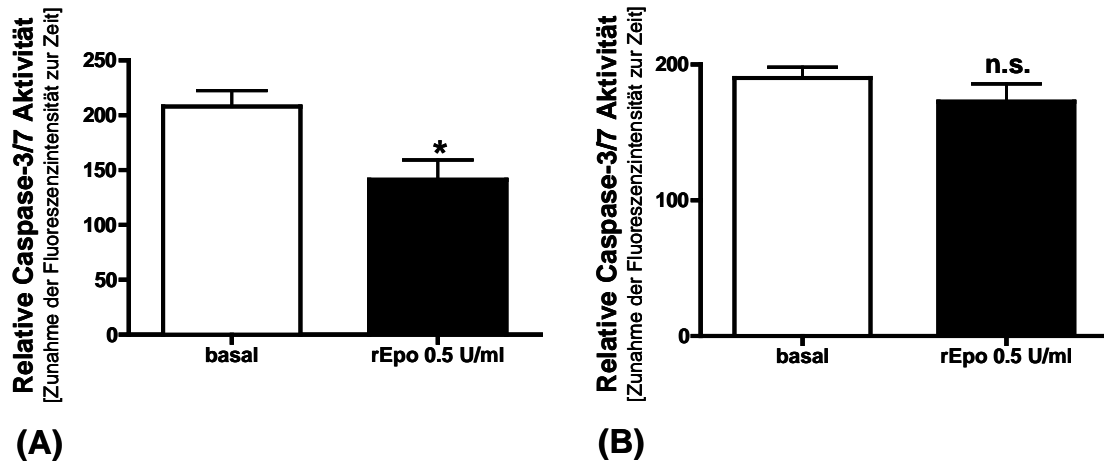


Abb.23:

***Einfluss von rEpo auf die Caspase-3/7 Aktivität in P15 Wholemount-Retinae.***

*P15 retinale Wholemounts wurden für 24h mit rEpo oder PBS (basal) kultiviert. Für die Durchführung des Caspase-Assays von Promega erfolgte die Homogenisierung der Proben in PBS. Die Caspase-3/7 Aktivität wurde als das Verhältnis der Zunahme der Fluoreszenzintensität zur Zeit bestimmt. (A) zeigt eine einzelne Versuchsdurchführung mit 5 Retinae in der Basal- und 4 Proben in der rEpo-behandelten Gruppe, die eine signifikante Reduktion der Caspase-3/7 Aktivität durch rEpo ergab. (B) fasst die Ergebnisse von n=3 Versuchsdurchführungen zusammen, in der die Signifikanz von (A) nicht bestätigt werden konnte. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3)*

Die Ergebnisse des Assays zeigten zunächst bei der ersten Versuchsdurchführung eine signifikante Reduktion der Caspase-3/7 Aktivität in den rEpo behandelten P15 Retinae im Vergleich zu den Kontrollen (Abb.23 A). Diese konnten allerdings in den darauf folgenden Versuchsansätzen nicht in dieser Deutlichkeit reproduziert werden. Die Zusammennahme aller drei Versuche (Abb.23 B) ergab deshalb keinen signifikanten Einfluss von rEpo auf die Caspase-3/7 Aktivität.

## **4 Diskussion**

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Epo nicht nur in Niere und Leber, sondern auch in anderen Organen einschließlich des Nervensystems exprimiert wird. Zwar wurde die Regulation des für die Epo-Expression wichtigsten Transkriptionsfaktors HIF zu großen Teilen erforscht, die genaue Steuerung der Epo-Expression durch das Zusammenspiel von HIF mit weiteren z.T. gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren ist jedoch noch nicht geklärt. Ebenso ist die Identifikation und Herkunft der Epo-exprimierenden Zellen im Nervensystem, aber ebenso wie in Leber und Niere noch nicht abschließend gelungen.

Während die physiologische Wirkung von Epo auf erythroide Zellen, die schon seit der Entdeckung von Epo selbst bekannt ist, eingehend untersucht wurde, sind die Kenntnisse über die protektive Funktion von Epo in Nervenzellen hauptsächlich auf pathologische Prozesse wie Ischämie (Kilic et al., 2005) oder oxidativen Stress (Digicaylioglu und Lipton, 2001) limitiert. Nur wenig wurde bisher über eine physiologische Funktion von Epo im Nervensystem berichtet und blieb auf die Embryonalentwicklung beschränkt (Yu et al., 2002; Tsai et al., 2006; Chen et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb erstmals die Expression und Wirkung von Epo während der postnatalen Entwicklung des Nervensystems thematisiert werden. Als Modell diente dabei die Retina als leicht erreichbarer und in ihrer Größe überschaubarer Teil des Gehirns. Diese wurde im Rahmen eines organotypischen Wholemount-Kultursystems *in vivo* nah untersucht. Insgesamt galt es zu klären, ob endogen in der Retina exprimiertes Epo einen bedeutsamen Beitrag zu einer adäquaten Retinaentwicklung leisten kann.

### **4.1 Retinale Epo-Expression während postnataler Entwicklung**

Da die Epo-Expression hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert wird (Fandrey, 2004), wurde zunächst das Epo-mRNS Expressionsmuster in der Retina während der postnatalen Entwicklung untersucht. Dabei ergab sich ein signifikanter Anstieg der Epo-mRNS Expression von Geburt an. Das Expressionsmaximum war an P9 erreicht, während anschließend die Expression auf das Niveau neugeborener Mäuse zurückkehrte. Diese Expressionssteigerung korrelierte zeitlich mit der sogenannten Neugeborenenanämie der Mäuse, die sich durch einen signifikanten Abfall der Hämoglobin- und Hämatokritwerte über einen Zeitraum von über drei Wochen äußerte, und als typisch für Säugetierspezies gilt (Halvorsen et al., 2002). Diese Neugeborenenanämie resultiert dabei, aus der verbesserten Oxygenierung des Hämoglobins nach der Geburt, die die Erythropoiese hemmt. Dieser Prozess in Kombination mit einer verringerten Überlebensdauer der fetalen

Erythrozyten und der gleichzeitigen Expansion des Blutvolumens führt zu einem progredienten Abfall der Hämoglobinkonzentration in neugeborenen Säugetieren (Green et al., 2004). Der Beginn der Epo-mRNS Expressionssteigerung in der Retina und der Neugeborenenanämie stimmten zeitlich in etwa überein, hingegen kehrte die Epo-Expression schon vor Ende der Anämie zu den Basalwerten zurück. Der Vergleich mit der Epo-mRNS Expression in Niere und Leber ergab ein ähnliches Expressionsmuster, das sich lediglich durch einen verspäteten Beginn und die Überlagerung durch den Expressionsortwechsel von Leber zu Niere unterschied. Demnach kann hieraus geschlussfolgert werden, dass die Epo-Expressionssteigerung in der Retina ebenso wie in Niere und Leber durch die Gewebhypoxie infolge der Anämie bedingt war. So zeigten zuvor schon Grimm et al., 2002, dass die mRNS-Expression in der adulten Retina durch hypoxische Präkonditionierung induziert werden kann, und dass ebenso auch andere klassische HIF-abhängige Gene wie VEGF während der ersten zwei Wochen nach der Geburt eine Expressionssteigerung erfahren (Grimm et al., 2005).

Die Verifizierung des Epo-Expressionsmusters auf Protein-Ebene scheiterte an dem fehlenden Nachweis des Epo-Proteins aufgrund der unzureichenden Sensitivität des ELISA. Die Proteinmengen lagen durchgehend unterhalb der Detektionsgrenze von 47 pg/ml. Schon vorangegangene Studien, die sich mit der neuroprotektiven Funktion von hypoxisch induziertem Epo in der Retina bzw. in corticalen Neuronen beschäftigten, beschränkten sich auf die Untersuchung der Epo-mRNS Expression und zeigten keinerlei Daten zur Proteinexpression (Grimm et al., 2002; Yu et al., 2002). Da die wesentliche Regulation auf der Ebene der Transkription und nicht im Rahmen der Translation zu erwarten ist, sollte die mRNS Expression im Prinzip auch das Proteinexpressionsmuster widerspiegeln. Darüber hinaus können bei parakriner Sekretion, wie sie für Epo in der Retina vorzuliegen scheint, selbst sehr niedrige Konzentrationen eine hohe lokale Wirkung erzielen.

Untersuchungen zur Identifikation des Zelltyps, der Epo im Nervensystem exprimiert, ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Eine Hypoxie-abhängige Epo-Expression konnte in primären Astrozyten, nicht aber in corticalen Neuronen adulter Mäuse gezeigt werden (Chavez et al., 2006), obwohl genau dieser Nachweis schon vor längerer Zeit in primären embryonalen corticalen Neuronen der Ratte erbracht worden war (Yu et al., 2002).

In der Retina wurde Epo mittels immunhistochemischer Färbungen in der Ganglien- und in der Inneren Körnerschicht lokalisiert (Morita et al., 2003). Allerdings kann dieser Nachweis nicht mit dem der Epo-exprimierenden Zellen gleichgesetzt werden, da Epo

sezerniert wird und ebenso an solchen Zellen detektiert wird, an deren Zelloberfläche Epo den EpoR bindet, die aber nicht unbedingt Epo exprimieren müssen. In dieser Arbeit wurden hingegen transgene Mäuse verwendet, die GFP unter der Kontrolle der Epo-Gen regulierenden Region exprimieren und in denen die GFP-Expression somit auf eine Epo-Expression hinweist (Suzuki et al., 2007). So konnten mittels immunhistochemischer Färbungen mit einem anti-GFP Antikörper Zellen in der Ganglienzellschicht als Epo-exprimierende Zellen identifiziert werden. Die Beurteilung ihrer Form, die sich durch einen deutlich zu erkennenden Neuriten und eine neuronentypische Somaform auszeichnete, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen auch wirklich um Ganglienzellen, also um Neurone, und nicht um Gliazellen, handelte. Die Ansiedlung der Epo-exprimierenden Zellen am Übergang der Pars optica zur Pars caeca der Retina, wie sie in den Cryostatschnitten der adulten Mäuse zu erkennen war, beruht vermutlich darauf, dass die Ganglienzellen von der Arteria centralis retinae versorgt werden, die über den Nervus opticus eintritt. Da sich ihre Äste als Endarterien darstellen (Lüllmann-Rauch, 2003), werden die Ganglienzellen in der Peripherie der Retina am schlechtesten mit Sauerstoff versorgt und am ehesten einer hypoxischen Stoffwechsellage ausgesetzt. Lediglich während der Manifestation der Neugeborenenanämie, die mit einer verminderten Sauerstoffkapazität des Blutes gleichbedeutend ist, ließen sich Epo-exprimierende Zellen auch in der Nähe der Eintrittsstelle des Nervus opticus sowie in größerer Anzahl nachweisen und spiegelten somit das mittels RT-real-time-PCR dargestellte Expressionsmuster wider.

Zusammenfassend konnte also das Expressionsmuster von Epo während der postnatalen Retinaentwicklung, einerseits als vergleichbar mit dem der klassischerweise Epo exprimierenden Organe Leber und Niere sowie andererseits durch das Auftreten der Neugeborenenanämie geprägt, charakterisiert werden. Darüber hinaus gelang es, die Epo-exprimierenden Zellen in der Ganglienzellschicht der Retina zu lokalisieren. Somit konnte eine lokale regulierte Epo-Expression während der postnatalen Retinaentwicklung durch zwei verschiedene Methoden nachgewiesen werden, wodurch eine Funktion von Epo in diesem Zeitraum in der Retina wahrscheinlich wird.



## 4.2 HIF-Expression und –Regulation in der murinen Retina

HIF ist als der bedeutendste Transkriptionsfaktor zur Regulation der Expression von Sauerstoff-abhängigen Genen, zu denen auch Epo zählt, bekannt. Die  $\alpha$ -Untereinheit unterliegt einer Regulation durch die Sauerstoffsensoren, PHDs und FIH, der Zelle, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheit konstitutiv im Zellkern vorliegt. Bei der Untersuchung der Regulation von HIF liegt der Fokus deshalb auf der  $\alpha$ -Untereinheit. Von dieser existieren verschiedene Isoformen, von denen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  bisher am besten erforscht sind und die wichtigsten zu sein scheinen. Während HIF-1 $\alpha$  ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von HIF-2 $\alpha$  auf bestimmte Gewebe beschränkt, zu denen unter anderem das Gehirn zählt. HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  weisen gemeinsame, aber auch eigene Zielgene auf. Der genaue Unterschied in ihrer Funktion konnte bisher noch nicht geklärt werden (Jelkmann, 2004; Gruber et al., 2007). Auch die Frage, ob Epo HIF-1 oder HIF-2 abhängig exprimiert wird, scheint für jedes Gewebe spezifisch untersucht werden zu müssen. Während embryonal HIF-1 $\alpha$  die Expression des systemischen Epos reguliert, nimmt diese Funktion im adulten Organismus HIF-2  $\alpha$  (Gruber et al., 2007).

Für die murine Retina konnte bereits gezeigt werden, dass die Epo-Expression durch Hypoxie induziert werden kann und mit einer HIF-1 $\alpha$  Akkumulation korreliert (Grimm et al., 2002; Grimm et al., 2005). Allerdings wiesen die Arbeiten von Chavez et al., 2006, nach, dass Epo in Astrozyten der Maus eindeutig HIF-2 $\alpha$ -abhängig exprimiert wird. Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage lässt sich demnach nicht sicher sagen, ob die Epo-Expression in der Retina auf einer Regulation von HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  beruht. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Nachweis von HIF-1 $\alpha$  an sich und die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie angestrebt.

Überraschenderweise zeigten sich im Western-Blot auch in den Retinae große Mengen an HIF-1 $\alpha$ , die eigentlich unter normoxischen Bedingungen, d.h. 21 % Sauerstoff, oder frisch präpariert untersucht worden waren. Da in den Versuchen Petri-Perm Zellkulturschalen mit einem gasdurchlässigen Boden verwendet wurden und deshalb von einer ausreichenden Sauerstoffsättigung des Mediums auszugehen war, ist die hypoxische Stoffwechsellaage dieser Retinae einerseits auf ihren hohen Sauerstoffverbrauch und andererseits auf die hohe Anzahl an Zellschichten dieser Wholemounts zurückzuführen, die vermutlich vor allem in den mittleren Zellschichten zu einem Sauerstoffmangel geführt hat. Die starke HIF-1 $\alpha$  Akkumulation in den frisch isolierten Retinae resultierte wahrscheinlich aus der noch immer bestehenden Neugeborenenanämie der Mäuse zu diesem Zeitpunkt, die sich in einem Organ mit einem hohen Sauerstoffverbrauch wie der Retina besonders auswirkt.

Denn schon Grimm et al., 2005, konnten zeigen, dass der HIF-1 $\alpha$  Gehalt an P5 und 9 in der Retina am höchsten ausfällt, bevor er in den darauf folgenden Tagen langsam sinkt. Die HIF-1 $\alpha$  Akkumulation in diesen Retinae wies also einen vergleichbaren Verlauf wie die Neugeborenenanämie unserer Mäuse auf und unterstützt somit meine Daten.

Um dennoch die Sauerstoffabhängigkeit der Regulation der HIF  $\alpha$ -Untereinheit in der Retina zu beweisen, wurden die Retinae mit einem hyperoxischen Luftgemisch begast. In den Western-Blot Analysen fand sich daraufhin signifikant weniger HIF-1 $\alpha$  in den Retinae, die unter 50 % Sauerstoff kultiviert worden waren, als in denen, die nur 21 % Sauerstoff ausgesetzt waren. Offensichtlich verbesserte sich durch die Hyperoxie der Luft die Sauerstoffversorgung der Retinae, so dass diese eine normoxische Stoffwechsellage aufwiesen und HIF-1 $\alpha$  abgebaut wurde. Es gelang zwar ebenfalls der Nachweis von HIF-2 $\alpha$  im Western-Blot, aber die Akkumulation in den Retinae mit 21 % Sauerstoff-Kulturbedingungen fiel im Vergleich zu HIF-1 $\alpha$  wesentlich geringer aus. Ebenso ließ sich die Menge an HIF-2 $\alpha$  nicht so deutlich durch Hyperoxie reduzieren.

Somit wurde festgestellt, dass die Retina als ein Organ mit dem höchsten spezifischen Sauerstoffverbrauch sehr schnell auf eine Reduktion des Sauerstoffangebotes reagiert und es in diesem Fall zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  kommt. Darüber hinaus wird HIF-1 $\alpha$  bei einer ausreichenden Sauerstoffversorgung fast vollständig abgebaut. Es findet sich zwar auch eine HIF-2 $\alpha$  Expression in retinalen Zellen, die aber deutlich unter der von HIF-1 $\alpha$  liegt. Außerdem scheint HIF-2 $\alpha$  auch nicht in einer mit HIF-1 $\alpha$  zu vergleichenden Sensitivität zu akkumulieren oder degradiert zu werden. Dies wirft die Frage auf, ob HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  sich nicht vielleicht auch in ihrer Bedeutung für akuten versus chronischen hypoxischen Stress unterscheiden. Sicherlich kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden, dass Epo in der Retina HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  abhängig exprimiert wird. Dies erforderte einen spezifischen Knock-out für die jeweiligen Isoformen, was den Umfang dieser Arbeit überschreiten würde. Dennoch relativiert alleine der Nachweis einer Hypoxie-abhängigen Akkumulation von HIF-2 $\alpha$  in der Retina die Hypothese vorangegangener Arbeiten, die die Epo-Expression in der Retina als HIF-1-induziert postuliert (Grimm et al., 2002) und fordert weitergehende Untersuchungen auf diesem Gebiet.

### 4.3 Funktionelle Bedeutung von Epo für eine adäquate Retinaentwicklung

Die grundlegende Voraussetzung für die Wirkung eines Faktors auf ein Gewebe stellt die Expression des zugehörigen Rezeptors in dem betreffenden Gewebe dar. Der EpoR-Expressionsnachweis in dieser Arbeit sollte demnach zunächst klären, ob die Retina während ihrer postnatalen Entwicklung EpoR exprimiert, und ob Epo somit in diesem Zeitraum eine Funktion vermitteln kann. Dabei gelang die ausnahmslose Detektion von EpoR-mRNS in allen retinalen Entwicklungsstufen von 0 bis 20 Tage alten Mäusen sowie in adulten Retinae, die somit eine kontinuierliche Wirkung von Epo in der Retina während der ersten drei Wochen nach der Geburt ermöglichte.

Da für diesen Nachweis allerdings cDNS von Wholemout-Retinae verwendet worden war, blieb dadurch unklar, welcher der verschiedenen retinalen Zelltypen EpoR exprimiert und einer Epo-Wirkung ausgesetzt ist. Diesbezügliche vorangegangene Untersuchungen lieferten kontroverse Ergebnisse. So konnte EpoR mittels Immunhistochemie auf den inneren Segmenten von Photorezeptorzellen sowie in der Äußeren Plexiformen und in der Inneren Körnerschicht, allerdings nicht in der Ganglienzellschicht, muriner Retinae lokalisiert werden (Grimm et al., 2002), wohingegen die immunhistochemischen Färbungen an Retinae der Ratte die Ganglienzellschicht als weiteren EpoR-Expressionsort charakterisierten (Yamasaki et al., 2005). Dabei wurde in beiden Studien derselbe anti-EpoR Antikörper verwendet. Kurze Zeit später stellte sich dann durch die Arbeiten von Elliott et al., 2005, heraus, dass alle kommerziell erhältlichen anti-EpoR Antikörper - einschließlich des in oben zitierten Veröffentlichungen verwendeten Produktes - in keiner Weise für immunhistochemische Färbungen und auch nur bedingt für Western-Blot Analysen geeignet sind. Da deshalb keine verlässlichen Ergebnisse von der Verwendung von EpoR-Antikörpern erwartet werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit von einem Nachweis von EpoR-Protein abgesehen.

Die Applikation von rekombinantem Epo auf retinale Wholemout-Kulturen führte während aller drei postnataler Zelltodphasen an P2, 9 und 15 zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoseraten. Diese Daten deuten darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung von Epo nicht auf exogen ausgelösten Zelltod limitiert ist, sondern ebenso in einem Modell von physiologisch auftretender Apoptose effektiv ist. Sie geben somit einen ersten Hinweis auf eine länger anhaltende Funktion von Epo während postnataler Retinaentwicklung.

Darüberhinaus konnte mittels immunzytochemischer Doppelmarkierungen gezeigt werden, dass Epo in diesem Modell sowohl retinale Ganglien- als auch

Photorezeptorzellen vor Apoptose schützt. Schlussfolgernd ist die durch Epo vermittelte Neuroprotektion nicht auf einen einzelnen Zelltyp limitiert. Epo scheint hingegen vielmehr einen umfassenden Einfluss auf Zelltod bzw. Überleben während der postnatalen Retinaentwicklung auszuüben. Diese Ergebnisse stimmen mit Aussagen anderer Untersucher überein, die durch Epo Photorezeptorzellen vor Licht-induzierter Apoptose (Grimm et al., 2002), aber auch Ganglienzellen vor Zelltodstimuli wie Axotomie (Weishaupt et al., 2004) zu schützen vermochten.

Die Diskrepanz, dass die höchste Menge an Epo-mRNS an P9 also gleichzeitig mit dem Eintreten einer Zelltodphase detektiert wurde, lässt sich insofern erklären, als dass die Apoptoserate in den darauffolgenden Tagen rasch sinkt und die Zelltodphase somit endet. Schon aus vorherigen Studien ist bekannt, dass proapoptotische Faktoren ihre höchste Aktivität kurz vor dem Eintreten der Zelltodphasen aufweisen (Beier et al., 2006). Apoptose während postnataler Retinaentwicklung stellt sich somit nicht als ein Prozess dar, der in sehr kurzer Zeit reguliert wird, sondern länger der Wirkung von Faktoren ausgesetzt sein muss, bevor die Effekte offenbar werden.

Da die postnatalen Zelltodphasen während der Retinaentwicklung durch das Zusammenspiel von pro- und antiapoptotischen Faktoren reguliert werden (Duenker, 2005), sollte die Interaktion von Epo mit solchen Faktoren exemplarisch an TGF- $\beta$  und Insulin untersucht werden, deren Funktion im Kontext der Retinaentwicklung schon gut erforscht ist (Dünker et al., 2005).

Wholemound-Kulturversuche mit einer simultanen TGF- $\beta$ - und Epo-Behandlung der P15 Retinae sollten Aufschluss über die Stärke der Epo-vermittelten Neuroprotektion geben. Die Ergebnisse zeigten, dass Epo nicht nur in der Lage war, den durch TGF- $\beta$  vermittelten Zelltod vollständig zu blockieren, sondern darüber hinaus noch geringere Apoptoseraten erwirken konnte als die Kontrollretinae aufwiesen. Einerseits konnte Epo somit als wirkungsvolles neuroprotektives Agens charakterisiert werden, andererseits sind diese Resultate sicherlich auch darauf zurückzuführen, dass TGF- $\beta$  ausschließlich Apoptose in Ganglienzellen initiiert (Beier et al., 2006), für Epo aber zusätzlich noch die Protektion von Photorezeptorzellen nachgewiesen wurde.

Bezüglich der Interaktion mit Insulin konnten durch die kombinierte Applikation von rekombinantem Epo und Insulin eine noch signifikant geringere Apoptoserate erreicht werden als schon die Einzelfaktorbehandlungen ergaben. Diese additive Effektverstärkung legt die Vermutung nahe, dass Epo und Insulin unterschiedliche Signalwege zur

Apoptoseinhibition aktivieren und somit die Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen gehemmt wird. Diese Hypothese sollte dann im letzten Kapitel mit überprüft werden.

#### **4.4 Molekulare Mechanismen der Funktion von Epo in der Retina**

Bezüglich der Signalwege, die von Epo in neuronalen Zellen aktiviert werden, lieferten vorangegangene Studien widersprüchliche Daten. In einem Modell von Axotomie-induziertem retinalen Zelltod wurde ERK-1/2, aber nicht Akt als verantwortlich für das durch Epo initiierte Zellüberleben gefunden (Kilic et al., 2005), wohingegen eine Aktivierung von sowohl ERK-1/2 als auch Akt in Epo behandelten ischämischen Arealen des Gehirns gefunden wurde (Kilic et al., 2005). ERK-1/2-Aktivierung zeichnete sich auch in Epo-behandelten diabetischen Retinae ab, die allerdings keinerlei Beteiligung des STAT5 Signalweges aufwiesen (Zhang et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde in retinalen Ganglienzellen der Ratte nach Axotomie und Epo-Applikation die PI-3-Kinase/Akt Kaskade als dominanter Signalweg identifiziert und keinerlei Hinweis auf eine Beteiligung von ERK-1/2 gefunden (Weishaupt et al., 2004).

Neuere Untersuchungen bezüglich Epo-Signalwegen in retinalen Zellen unterstützen die Hypothese, dass die aktivierten Signalwege hauptsächlich von dem jeweiligen Zelltodstimulus abhängig sein könnten. In diesen Studien führte die Inhibition von Jak2 nämlich nur bei induziertem, nicht aber bei genetisch bedingtem Zelltod zu einer Neuroprotektion (Samardzija et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit hingegen führte die Applikation von rekombinantem Epo in erster Linie zu einer signifikanten Steigerung der STAT5-Phosphorylierung in den Retinae. Da hier nicht exogen initiiertes, sondern physiologischer Zelltod untersucht wurde, ist es nicht überraschend, dass die aktivierten Signalwege von denen der vorher genannten Studien abweichen. Stattdessen spiegeln sie eine klassische EpoR-Aktivierung wider, wie sie für die Funktion von Epo in erythroiden Progenitorzellen typisch ist, in denen die Apoptose ebenfalls einen physiologischen Vorgang repräsentiert. Ebenso wird die Wirkung von Epo in neuronalen Progenitorzellen während der Embryonalentwicklung des Gehirns - auch ein Modell physiologischer Apoptose - hauptsächlich über die Phosphorylierung von Jak2 und STAT5 vermittelt (Yu et al., 2002).

Darüber hinaus konzentriert sich diese Arbeit auf Signalmoleküle, deren wichtige Bedeutung für die Regulation von retinaler Apoptose während postnataler Entwicklung bekannt ist wie die Mitglieder der Bcl-2- Familie (Guérin et al., 2006), Bax (Péquignot et al., 2003) und Bcl-2 (Duenker, 2005). Während Epo die mRNS-Expression des

proapoptotischen Bax in P15 Retinae signifikant senkte, blieb die m-RNS Expression des antiapoptotischen Bcl-2 in diesen Proben unverändert. Diese Daten legen somit nahe, dass die Apoptose in der sich entwickelnden Mausretina verhindert wird, indem Epo durch ein Verschieben des Gleichgewichtes der Bcl-2 Familie zu Gunsten der anti-apoptotischen Mitglieder den mitochondrialen Apoptosesignalweg hemmt. Dies könnte auch einen Anhaltspunkt für die Interaktion von Epo mit Insulin darstellen. Da Insulin hauptsächlich die Bcl-2-Expression steigert (Duenker et al., 2005), Epo aber die Bax-Expression senkt, reduzieren beide Faktoren zusammen die Permeabilität der Mitochondrienmembran stärker als allein und hemmen somit auch verstärkt die Apoptose.

Da TGF- $\beta$  Apoptose in retinalen Zellen unter anderem durch die Reduktion der Bcl-2 Expression vermittelt, könnte die Regulation der Mitglieder der Bcl2- Familie eine wichtige Schnittstelle der Interaktion zwischen Epo und Insulin als antiapoptotische Faktoren auf der einen und TGF- $\beta$  als proapoptotisches Agens auf der anderen Seite präsentieren. Meine Daten werden unterstützt durch vorangegangene Arbeiten, die auch eine Wirkung von Epo auf die Bcl-2 Familie zeigen. So induziert Epo in neuronalen Progenitorzellen während der Embryonalentwicklung die Expression von Bcl-xL (Yu et al., 2002) und hemmt marginal die Bid-Expression in retinalen Ganglienzellen der Ratte (Yamasaki et al., 2005).

Aufgrund der Tatsache, dass Caspasen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Apoptose einnehmen (Vecino et al., 2004) und Epo in retinalen Ganglienzellen der Ratte insbesondere die Caspase-3 Aktivität senkt (Weishaupt et al., 2004), lag es nahe, die Wirkung von Epo auf die Caspase-Aktivität in unserem Modell zu untersuchen. Obwohl Epo in einzelnen Versuchen die Caspase-3 Aktivität durchaus senkte, gelang es nicht, diesen Effekt konstant nachzuweisen. Dies könnte entweder an der zu geringen Sensitivität des Assays liegen oder durch die Caspase-3 Aktivität der Zellen der Retina überlagert werden, die nicht auf Epo reagieren und sicherlich den größeren Anteil an retinalen Zellen darstellen. Somit ließ sich der Einfluss von Epo auf die Caspase-3 Aktivität nicht sicher nachweisen, ebenso wenig konnte er aber ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Epo in der Retina während der ersten drei Wochen nach der Geburt hypoxieabhängig von retinalen Ganglienzellen exprimiert wird und dass die beiden für eine Expressionsregulation von Epo infrage kommenden Isoformen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in der Retina exprimiert und sauerstoffabhängig reguliert werden. Darüber hinaus erfolgte der Nachweis einer

umfassenden und lang anhaltenden neuroprotektiven Aktivität von Epo während der gesamten postnatalen Retinaentwicklung, die sich sowohl auf retinale Ganglien- als auch auf Photorezeptorzellen auswirkt. Außerdem konnte geklärt werden, dass Epo seine Wirkung über den STAT5 Signalweg und durch die Hemmung des mitochondrialen Apoptosesignalweges vermittelt. Dabei wurde Epo als starkes neuroprotektives Agens charakterisiert, das mit weiteren die Retinaentwicklung beeinflussenden Faktoren interagiert. Somit scheint Epo maßgeblich zu einer adäquaten postnatalen Retinaentwicklung beizutragen.

Schlussfolgernd erbringt die vorliegende Arbeit erstmals den Nachweis, dass Epo seine postnatale neuroprotektive Funktion nicht nur im Rahmen von pathologischem Zelltod vermittelt, sondern auch in einem Modell physiologischer Apoptose wirksam ist.

## 5 Zusammenfassung

Das hämatopoietische Hormon Erythropoietin wird nicht nur in Niere und Leber, sondern auch in weiteren Organen einschließlich des Nervensystems exprimiert und vermittelt dort neuroprotektive Wirkung. Die Expression und Funktion von Erythropoietin im Nervensystem wurde bisher insbesondere anhand von Modellen pathologischer Zelltodprozesse charakterisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Erythropoietin in neuronalen Zellen erstmals an einem Modell physiologischer postnataler Apoptose untersucht, wie sie während der Entwicklung der murinen Retina, einem leicht erreichbaren Teil des Zwischenhirns, auftritt.

Es konnte gezeigt werden, dass Epo während der Entwicklung der Mausretina in den ersten drei Wochen nach der Geburt von Ganglienzellen exprimiert wird. Diese Expression erfolgt sauerstoffabhängig und ist in erster Linie durch die Neugeborenenanämie der Mäuse geprägt, wodurch ein mit Leber und Niere vergleichbares Expressionsmuster in diesem Zeitraum zu erkennen ist. Beide für die Regulation von Erythropoietin infrage kommenden Isoformen des Hypoxie-induzierbaren Faktors, Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 und 2, werden dabei in der Retina exprimiert und akkumulieren hypoxieabhängig.

Darüber hinaus konnte unter Verwendung von in-vivo nahen organotypischen Wholemount-Kulturen nachgewiesen werden, dass Epo während der Retinaentwicklung neuroprotektive Aktivität vermittelt, die alle postnatalen Zelltodphasen umfasst und sowohl auf retinale Ganglien- als auch auf Photorezeptorzellen wirkt. Außerdem erfolgte der Nachweis einer synergistischen Interaktion mit Insulin sowie einer antagonistischen Interaktion mit dem Transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ .

Schließlich erfolgte die Aufklärung der Signalwege, über die Epo seine Funktion auf diese Zellen ausübt, zu denen im Wesentlichen der Signal Vermittler und Transkriptions-Aktivator 5 Signalweg und die Expressionsminderung von Bax als Einflussnahme auf die mitochondriale Apoptosekaskade zählen.

Somit ermöglicht diese Arbeit die Schlussfolgerung, dass Erythropoietin als starkes neuroprotektives Agens im Zusammenspiel mit anderen Einfluss nehmenden Faktoren maßgeblich zu einer adäquaten postnatalen Retinaentwicklung beiträgt und somit auch im Rahmen von physiologischen Zelltodprozessen eine wichtige neuroprotektive Funktion vermitteln kann.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Beier M., Franke A., Paunel-Gorgülü A.N., Scheerer N., Duenker N. (2006):  
Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all programmed cell death periods of the developing murine retina.  
Neurosci Res. 56, 193-203.
2. Brines M.L., Ghezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle N.C., Cerami C., Itri L.M., Cerami A. (2000):  
Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 10526-31.
3. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. (2004):  
Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 14907-12.
4. Bruce, A. (2004):  
Molekularbiologie der Zelle. 4. Ed. Weinheim:  
Wiley-VCH Verlag; s. bes. Kapitel 17.4
5. de Caestecker M. (2004):  
The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.  
Cytokine Growth Factor Rev. 15, 1-11.
6. Carnot P., Deflandre C. (1906):  
Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang.  
C R Acad Sci. 143, 384-386.

7. Chavez J.C., Baranova O., Lin J., Pichiule P. (2006):  
The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes.  
J Neurosci. 26, 9471-81.
8. Chen Z.Y., Asavaritikrai P., Prchal J.T., Noguchi C.T. (2007):  
Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation.  
J Biol Chem. 282, 25875-83.
9. Chomczynski P., Sacchi N. (1987):  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction.  
Anal. Biochem. 162, 156–159.
10. Dame C., Fahnenstich H., Freitag P., Hofmann D., Abdul-Nour T., Bartmann P., Fandrey J. (1998):  
Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue.  
Blood. 92, 3218-25.
11. Dame C., Sola M.C., Lim K.C., Leach K.M., Fandrey J., Ma Y., Knöpfle G., Engel J.D., Bungert J. (2004):  
Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4.  
J Biol Chem. 279, 2955-61.
12. Digicaylioglu M., Lipton SA. (2001):  
Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades.  
Nature. 412, 641-7.

13. Duenker N., Valenciano A.I., Franke A., Hernández-Sánchez C., Dressel R., Behrendt M., De Pablo F., Krieglstein K., de la Rosa E.J. (2005):  
Balance of pro-apoptotic transforming growth factor-beta and anti-apoptotic insulin effects in the control of cell death in the postnatal mouse retina.  
*Eur J Neurosci.* 22, 28-38.
14. Duenker N. (2005):  
Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and programmed cell death in the vertebrate retina.  
*Int Rev Cytol.* 245, 17-43.
15. Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., Cepek L., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck H.H., Breiter N., Jacob S., Knerlich F., Bohn M., Poser W., Rütther E., Kochen M., Gefeller O., Gleiter C., Wessel T.C., De Ryck M., Itri L., Prange H., Cerami A., Brines M., Sirén A.L. (2002):  
Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.  
*Mol Med.* 8, 495-505.
16. Eid T., Brines M. (2002):  
Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence?  
*Clin Breast Cancer.* 3, S109-15.
17. Elliott S., Busse L., Bass M.B., Lu H., Sarosi I., Sinclair A.M., Spahr C., Um M., Van G., Begley C.G. (2006):  
Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression.  
*Blood.* 107, 1892-5.
18. Fandrey J. (2004):  
Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286, R977-88.

19. Franke A.G., Gubbe C., Beier M., Duenker N. (2006):  
Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic proteins: cooperative players in chick and murine programmed retinal cell death.  
J Comp Neurol. 495, 263-78.
  
20. Grimm C., Wenzel A., Groszer M., Mayser H., Seeliger M., Samardzija M., Bauer C., Gassmann M., Remé C.E. (2002):  
HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration.  
Nat Med. 8, 718-24.
  
21. Grimm C., Wenzel A., Stanescu D., Samardzija M., Hotop S., Groszer M., Naash M., Gassmann M., Remé C. (2004):  
Constitutive overexpression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration.  
J Neurosci. 24, 5651-8.
  
22. Grimm C., Hermann D.M., Bogdanova A., Hotop S., Kilic U., Wenzel A., Kilic E., Gassmann M. (2005):  
Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration.  
Semin Cell Dev Biol. 16, 531-8.
  
23. Gruber M., Hu C.J., Johnson R.S., Brown E.J., Keith B., Simon M.C. (2007):  
Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 2301-6.
  
24. Guerin M.B., McKernan D.P., O'Brien C.J., Cotter T.G. (2006):  
Retinal ganglion cells: dying to survive.  
Int J Dev Biol. 50, 665-74.
  
25. Halvorsen S., Bechensteen A.G. (2002):  
Physiology of erythropoietin during mammalian development.  
Acta Paediatr Suppl. 91, 17-26.

26. Green TP., Franklin WH., Tanz RR (2004):  
Pediatrics. 1.Ed. Columbus:  
McGraw-Hill Verlag; s. bes. Kapitel 23
  
27. Imagawa S., Yamamoto M., Miura Y. (1997):  
Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA  
transcription factors.  
Blood. 89, 1430-9.
  
28. Jelkmann W. (2004):  
Molecular biology of erythropoietin.  
Intern Med. 43, 649-59.
  
29. Jelkmann W., Wagner K. (2004):  
Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin.  
Ann Hematol. 83, 673-86.
  
30. Jelkmann W. (2007):  
Erythropoietin after a century of research: younger than ever.  
Eur J Haematol. 78, 183-205.
  
31. Kilic U., Kilic E., Soliz J., Bassetti C.I., Gassmann M., Hermann D.M. (2005):  
Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion  
cells by activating ERK-1/-2.  
FASEB J. 19, 249-51.
  
32. Kilic E., Kilic U., Soliz J., Bassetti C.L., Gassmann M., Hermann D.M. (2005):  
Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual  
activation of ERK-1/-2 and Akt pathways.  
FASEB J. 19, 2026-8.

33. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951):  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J Biol Chem. 193, 265-75.
34. Lüllmann-Rauch, R. (2003):  
Histologie. Stuttgart, New York:  
Georg Thieme Verlag, s. bes. S. 508
35. Maxwell P.H., Osmond M.K., Pugh C.W., Heryet A., Nicholls L.G., Tan C.C., Doe B.G., Ferguson D.J., Johnson M.H., Ratcliffe P.J. (1993):  
Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice.  
Kidney Int. 44, 1149-62.
36. Morita M., Ohneda O., Yamashita T., Takahashi S., Suzuki N., Nakajima O., Kawauchi S., Ema M., Shibahara S., Udonon T., Tomita K., Tamai M., Sogawa K., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y. (2003):  
HLF/HIF-2alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin.  
EMBO J. 22, 1134-46.
37. Péquignot M.O., Provost A.C., Sallé S., Taupin P., Sainton K.M., Marchant D., Martinou J.C., Ameisen J.C., Jais J.P., Abitbol M. (2003):  
Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina.  
Dev Dyn. 228, 231-8.
38. Remé C.E., Grimm C., Hafezi F., Wenzel A., Williams T.P. (2000):  
Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision.  
News Physiol Sci. 15, 120-124.
39. de la Rosa, E.J., Díaz, B., De Pablo, F., (1998):  
Organoculture of the chick embryonic neuroretina.  
Curr. Top. Dev. Biol. 36, 133-144.

40. Sadler T.W. (2003):  
Medizinische Embryologie. 10. Ed. Stuttgart:  
Georg Thieme Verlag; s. bes. S.158, 368ff
41. Samardzija M., Wenzel A., Aufenberg S., Thiersch M., Remé C., Grimm C. (2006):  
Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations.  
FASEB J. 20, 2411-3.
42. Shankland M., Macagno E.R. (1992):  
Determinants of neuronal identity. San Diego, New York, Boston (usw.):  
Academic Press, Inc; s. bes. Kapitel 13
43. Shingo T., Sorokan S.T., Shimazaki T., Weiss S. (2001):  
Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors  
by mammalian forebrain neural stem cells.  
J Neurosci. 21, 9733-43.
44. Suzuki N., Ohneda O., Takahashi S., Higuchi M., Mukai H.Y., Nakahata T.,  
Imagawa S., Yamamoto M. (2002):  
Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant  
mice from lethality.  
Blood. 100, 2279-88.
45. Suzuki N., Obara N., Yamamoto M. (2007):  
Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression.  
Methods Enzymol. 435, 157-77.
46. Tsai P.T., Ohab J.J., Kertesz N., Groszer M., Matter C., Gao J., Liu X., Wu H.,  
Carmichael S.T. (2006):  
A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery.  
J Neurosci. 26, 1269-74.

47. Vecino E., Hernández M., García M. (2004):  
Cell death in the developing vertebrate retina.  
*Int J Dev Biol.* 48, 965-74.
48. Weishaupt J.H., Rohde G., Pölking E., Siren A.L., Ehrenreich H., Bähr M. (2004):  
Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 1514-22.
49. Wenger R.H. (2002):  
Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression.  
*FASEB J.* 16, 1151-62.
50. Yamasaki M., Mishima H.K., Yamashita H., Kashiwagi K., Murata K., Minamoto A., Inaba T. (2005):  
Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells.  
*Brain Res.* 1050, 15-26.
51. Yu X., Shacka J.J., Eells J.B., Suarez-Quian C., Przygodzki R.M., Beleslin-Cokic B., Lin C.S., Nikodem V.M., Hempstead B., Flanders K.C., Costantini F., Noguchi C.T. (2002):  
Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development.  
*Development.* 129, 505-16.
52. Youssoufian H., Longmore G., Neumann D., Yoshimura A., Lodish H.F. (1993):  
Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor.  
*Blood.* 81, 2223-36.
53. Zhang J., Wu Y., Jin Y., Ji F., Sinclair S.H., Luo Y., Xu G., Lu L., Dai W., Yanoff M., Li W., Xu G.T. (2008):  
Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 732-42.



## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALK	Aktivin-ähnliche Kinase
Aqua dest.	destiliertes Wasser
ARNT	Aryl-Kohlenwasserstoff nukleärer Tranlokator
Asp	Aspartat
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BMP	Knochenwachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNS	complementary DNS
CER	Zytoplasma Extraktions Reagenz
CFU	Kolonie-formierende Einheit
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoff-Monoxid
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	2'4'Diamindino-2-phenylindol dihydrochlorid
DME-Medium	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
Epo	Erythropoietin
EpoR	Epo Rezeptor
ERK-1/-2	p42-/p44-MAP-Kinase
f	Femto-
Fe	Eisen
FIH-1	HIF-inhibierender Faktor-1
g	Gramm
βcR	Gemeinsamer β-Rezeptor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat

---

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde
HBS	HIF-Bindungsstelle
HCL	Salzsäure
HCP	Hämatopoietische Zellphosphatase
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HNF-4	Hepatischer Nukleärer Faktor-4
HOX	Hypoxie
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	Merrettich-Peroxidase
Jak2	Januskinase 2
Il	Interleukin
l	Liter
m	Milli-
μ	Mikro-
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NER	Kern Extraktions Reagenz
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
NOX	Normoxie
NT	Neurotrophin
N-Terminus	Amino-Terminus
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ODD	Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne
P	postnataler Tag
PBS	phosphatgepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase

PI-3K/Akt	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
%	Prozent
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
r	rekombinant
R110	Rhodamin110
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Ser	Serin
STAT5	Signal Vermittler und Transkriptions-Aktivator 5
TAD	trans-aktivierende Domäne
TBS	Tris-Base gepufferte Saline
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
Trk	Tyrosinkinase
Trp	Tryptophan
V	Volt
Val	Valin
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Fandrey für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation am Institut für Physiologie der Universität Essen und für die großartige Unterstützung, durch die nicht nur diese Arbeit, sondern auch der Aufenthalt in Japan, die Förderung durch Stipendien und die Teilnahme an vielen internationalen Kongressen realisierbar geworden sind.

Ich danke Frau Prof. Dr. Nicole Dünker für die gute Kooperation mit dem Institut für Neuroanatomie der Universität Duisburg-Essen, insbesondere für die Einführung in die Retinapräparation, Wholemount-Kultur, Apoptosedetektion und Immunzytochemie sowie für die wissenschaftlichen Anregungen und die umfassende Unterstützung.

Frau Patricia Freitag danke ich für die geduldige und umfangreiche Einweisung in die Labortechnik und für die vielen wertvollen hilfreichen Tipps und die wissenschaftliche Diskussion.

Ebenso danke ich Frau Ulrike Laub und Frau Ute Jonetat für die technische und persönliche Unterstützung im Institut für Neuroanatomie.

Frau Dr. Stilla Frede stand mir jederzeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite und bereicherte stets die wissenschaftliche Diskussion zu meiner Arbeit. Außerdem danke ich ihr für die Hilfe beim Primerdesign und bei der Sequenzierung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Masayuki Yamamoto und Herrn Dr. Shighiko Imagawa, die meinen Forschungsaufenthalt in Tsukuba, Japan, möglich gemacht haben sowie Herrn Dr. Norio Suzuki, Frau Dr. Xiaoqing Pan und Frau Naomi Kaneko für die unbeschreibliche Gastfreundschaft und die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Arbeit in Japan.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Christoph Wotzlaw für die technische Unterstützung rund um den mikroskopischen Teil dieser Dissertation.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der Institute für Physiologie und Neuroanatomie für die freundliche, angenehme und stets hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, die mir die Arbeit zur Freude machte.

Außerdem danke ich meiner Familie, die mir in erfolgreichen sowie schwierigen Zeiten stets zur Seite gestanden und mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt hat.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Scheerer
Vornamen	Nina Alexandra
Wohnort	Castrop-Rauxel
Geburtsdatum	28. April 1984
Geburtsort	Bochum
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1990-1994	Friedrich-Harkort-Grundschule, Castrop-Rauxel
1994-2003	Adalbert-Stifter-Gymnasium, Castrop-Rauxel

### Akademischer Werdegang

10/2003-11/2009	Medizinstudium an den Universitäten Duisburg-Essen und zu Köln
11/2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15.12.2009	Approbation als Ärztin
seit 09/2005	Dissertation im Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen bei Herrn Prof. Dr. J. Fandrey

### Beruflicher Werdegang

seit 15.01.2010	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen
-----------------	---

### Stipendien

05/2006-11/2006	Doktorandenstipendium IFORES der Universität Duisburg-Essen
01/2007-12/2009	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
07/2007-10/2007	Stipendium des Chihiro and Kiyoko Yokochi Fund der Kanehara Ichiro Foundation für den Forschungsaufenthalt in Japan
08/2008	Reisestipendium der Allianz für das PJ-Tertial in der Schweiz

### Auslandsaufenthalte

23.07.2007-28.10.2007	Forschungsaufenthalt an der Tsukuba University, Japan
25.08.2008-14.12.2008	PJ-Tertial in der Chirurgie des Kantonsspitals Winterthur, Schweiz
06.04.2009-26.07.2009	PJ-Tertial in der Internistischen Klinik der Université Louis Pasteur Strasbourg, Frankreich